

Aus dem Institut für Physiologische Chemie

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. Rust

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**MikroRNA-Regulation bei verschiedenen  
antikonvulsiven und antiepileptogenen  
elektrischen Hirnstimulationsparadigmen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Lara Sophie Costard, geb. Zerbach**  
aus Mainz

Marburg, 2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am  
23.10.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. G. Schratt und Prof. Dr. F. Rosenow

1. Korreferent: Prof. Dr. T. Plant

## Inhalt

1. Zusammenfassungen .....	1
1.1. Zusammenfassung .....	1
1.2. Abstract .....	3
2. Einleitung .....	5
2.1. Anfälle und Epilepsien .....	5
2.1.1. Definitionen und Klassifikation .....	5
2.1.2. Epidemiologie .....	5
2.1.2. Allgemeine Pathophysiologie .....	6
2.1.3. Klinisches Bild .....	7
2.1.4. Elektroencephalographie (EEG) .....	7
2.1.5. Prinzipien für die Therapie der Epilepsien .....	8
2.2. Mesiale Temporallappenepilepsie .....	15
2.2.1. Epidemiologie und klinisches Bild .....	15
2.2.2. Anatomie .....	16
2.2.3. Pathophysiologie .....	16
2.3. Krankheitsmodelle .....	17
2.4. MikroRNAs .....	22
2.4.1. Grundlagen .....	22
2.4.2. Therapeutische Anwendung .....	24
2.4.3. MiRNAs und Epilepsie .....	25
2.4.4. MiRNAs und DBS .....	26
2.5. Ziele und Hypothesen .....	27
3. Material und Methoden .....	28
3.4. Versuchstiere .....	28
3.5. Material .....	28
3.6. Geräte/Software .....	30
3.4. Methoden .....	31

---

3.4.1. Elektroden- und Transmitterimplantation .....	31
3.4.2. Evozierte Potentiale .....	34
3.4.3. Kontinuierliches Video-EEG Monitoring .....	36
3.4.4. Tractus Perforans Stimulation .....	36
3.4.5. Langzeitstimulation (DBS) .....	37
3.4.6. Transaortale Perfusion .....	38
3.4.7. EEG-Analyse .....	39
3.4.8. MikroRNA „high-throughput-sequencing“ .....	39
3.4.9. RNA-Isolation .....	40
3.4.10. Reverse Transkription .....	41
3.4.11. Quantitative real-time PCR .....	41
3.5. Versuchsablauf .....	43
3.6. Auswertung und Statistik .....	47
3.6.1. Statistik .....	47
3.6.2. miRNA-Target-Analyse .....	49
4. Ergebnisse .....	51
4.1. Anzahl der verwendeten Ratten .....	51
4.2. Evozierte Potentiale .....	52
4.3. EEG-Muster .....	53
4.4. Effekt der DBS auf das Auftreten spontaner Anfälle .....	55
4.4.1. Latenzperiode nach DBS während der Epileptogenese .....	55
4.4.2. Anfallsfrequenz nach DBS während manifester Epilepsie .....	56
4.5. MikroRNA-Regulation nach VHC-DBS .....	59
4.6. MikroRNA-Target-Interaktion .....	79
4.7. Validierung potentieller Targets der miRNA-433-3p .....	82
4.8. Signalweg-Analyse .....	84
5. Diskussion .....	88
5.1. Evozierte Potentiale .....	88

5.2. Klinische Effekte der DBS .....	89
5.3. Einfluss der VHC-DBS auf mikroRNAs .....	93
5.4. Mögliche miRNA-gesteuerte Mechanismen der antiepileptogenen VHC-DBS. ....	105
5.5. Stärken und Limitationen der verwendeten Methoden .....	110
5.6. Mögliche Gründe für Abweichungen innerhalb einer Gruppe.....	113
5.7. Übertragbarkeit .....	117
5.8. Zusammenfassung und Ausblick .....	118
5. Abkürzungsverzeichnis .....	121
6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	125
Verzeichnis der Akademischen Lehrer .....	149
Danksagung .....	150

# 1. Zusammenfassungen

## 1.1. Zusammenfassung

**Hintergrund:** Weltweit leiden etwa 50 Millionen Menschen unter Epilepsie. Bis zu 80 % der Patienten mit der häufigen mesialen Temporallappenepilepsie (mTLE) sind resistent gegen pharmakologische Behandlung. Viele von ihnen können nicht durch einen resektiven epilepsiechirurgischen Eingriff geheilt werden. Für diese Patienten ist eine tiefe Hirnstimulation (deep brain stimulation; DBS) eine alternative Behandlungsmöglichkeit. Die Wirkmechanismen der DBS sind nur unzureichend verstanden.

MikroRNAs (miRNAs) sind kleine, einzelsträngige RNAs, die die Proteinsynthese auf der Ebene der messenger RNA (mRNA) regulieren. Es wurde festgestellt, dass zahlreiche miRNAs bei experimenteller und menschlicher Epilepsie reguliert sind. DBS bei Parkinson-Patienten ist mit veränderter miRNA-Expression im Blut assoziiert.

Wir haben verschiedene Ziele und Paradigmen der DBS in einem Rattenmodell der mTLE getestet, um Stimulationsparadigmen zu identifizieren, die die Epileptogenese inhibieren oder zu einer Anfallsreduktion bei manifester Epilepsie führen. Anschließend haben wir die miRNA-Expression im Hippokampus nach DBS mit dem effektivsten Paradigma untersucht.

**Methoden:** Wir haben ein mTLE-Modell bei Ratten basierend auf elektrischer Stimulation des Tractus perforans (perforant pathway stimulation; PPS) verwendet. Stimulationselektroden wurden in den PP implantiert, und Ableitelektroden wurden in den Gyrus dentatus (DG) implantiert. Nach einer Woche wurde der PP an zwei aufeinanderfolgenden Tagen für 30 Minuten und am dritten Tag für 8 Stunden stimuliert. Die Tiere entwickelten innerhalb von 12 bis 34 Tagen nach der Stimulation spontane Anfälle.

Die antiepileptogene und antikonvulsive Wirksamkeit der DBS vier verschiedener Ziele wurde untersucht: des PP, der Fimbria-Fornix-Formation (FF), des DG und der ventralen hippokampalen Kommissur (VHC). Die Stimulation wurde für eine oder zwei Wochen beginnend einen Tag nach dem letzten PPS angewendet, um einen antiepileptogenen Effekt zu untersuchen, oder nach dem ersten spontanen Anfall, um einen krankheitsmodifizierenden Effekt zu testen. Es wurden drei verschiedene Stimulationsparadigmen verwendet: 130 Hz und 0,1 V, 5 Hz und 2 V oder 1 Hz und 1 V.

Wir haben die miRNA-Expression im Hippokampus unmittelbar nach DBS und nach 97 Tagen kontinuierlichem Video-EEG-Monitoring gemessen. Dafür wurde eine Sequenzierung inhibitions-kompetenter miRNAs im Hippokampus durchgeführt und mit Kontrollratten verglichen, die nicht mit DBS behandelt wurden.

**Ergebnisse:** Kein DBS-Paradigma verringerte die Anfallsfrequenz bei Ratten, die bereits Epilepsie entwickelt hatten. Eine zweiwöchige DBS der VHC mit 1 Hz und 1 V verlängerte die Latenzzeit im PPS-Modell signifikant von 19 ( $\pm$  11) auf 56 ( $\pm$  23) Tage. Die Expression von 8 miRNAs war unmittelbar nach DBS signifikant reguliert. Fünf miRNAs (miRNA-129-5p, miRNA-379-3p, miRNA-410-3p, miRNA-431 und miRNA-433-3p) waren in der Kontrollgruppe nach 97 Tagen signifikant hochreguliert, zeigten jedoch keine Veränderungen in der mit DBS behandelten Gruppe.

**Schlussfolgerung:** Keines der getesteten Paradigmen wirkte antikonvulsiv. Die LFS der VHC hatte eine antiepileptogene Wirkung. Die antiepileptogene VHC-Stimulation führte zu einer akuten Expressionsänderung von 8 miRNAs und hemmte die PPS-induzierte Langzeitveränderungen von 5 miRNAs. Diese miRNAs sind Kandidaten für eine *in vivo*-Manipulation zur Hemmung der Epileptogenese.

## 1.2. Abstract

**Rationale:** Epilepsy is a common neurological disorder with an incidence of 50.4 per 100 000 per year. Up to 80 % of mesial temporal lobe epilepsy (mTLE) patients are resistant to pharmacological treatment. Many of them do not qualify for resective brain surgery. For these patients, an alternative treatment is deep brain stimulation (DBS). In epilepsy, different protocols for DBS have been tested but until now, the mechanisms of DBS are not fully understood and the best protocol remains to be evaluated.

MicroRNAs (miRNAs) are small, single stranded RNAs, which regulate protein synthesis on messengerRNA (mRNA) level. Various miRNAs have been found to be regulated in epilepsy, and regulation of miRNAs after DBS has been shown in Parkinson's disease patients.

We compared different targets and frequencies of DBS in a rat model of mTLE to identify stimulation paradigms that inhibit epileptogenesis or lead to seizure reduction in manifest epilepsy. We then investigated miRNA regulation after DBS with the most effective paradigm.

**Methods:** We used a rat perforant pathway stimulation (PPS) model of mTLE (Norwood et al., 2010). Stimulation electrodes were implanted into the PP and recording electrodes were implanted into the dentate gyrus (DG). After one week of recovery, the perforant pathway was stimulated on two consecutive days for 30 min and on the third day for 8 h. The animals developed epilepsy within 12 to 34 days after stimulation.

We investigated DBS of four different targets: the PP, the fimbria fornix formation (FF), the DG and the ventral hippocampal commissure (VHC). Stimulation was applied for one or two weeks starting one day after the final PPS to investigate an antiepileptogenic effect or starting after the first spontaneous seizure occurred to test a disease modifying effect. Three different stimulation paradigms were used: 130 Hz and 0.1 V, 5 Hz and 2 V or 1 Hz and 1 V, respectively.

We analyzed miRNA expression in the hippocampus immediately after DBS and after 97 days of continuous video EEG monitoring. Therefore, miRNA-sequencing was performed and compared to control rats that were not treated with DBS.

**Results:** No DBS paradigm decreased seizure frequency in animals that already had developed epilepsy. Two-week DBS of the VHC with 1 Hz and 1 V significantly prolonged the latency period in the PPS model from 19 ( $\pm 11$ ) to 56 ( $\pm 23$ ) days. Expression of



8 miRNAs were significantly altered immediately after DBS. Five miRNAs were significantly altered in the control group after 97 days but showed no changes in the DBS-treated group.

**Conclusion:**

1. None of the tested paradigms acted anticonvulsive.
2. LFS of the VHC had an antiepileptogenic effect.
3. Antiepileptogenic VHC-stimulation led to an acute expression change of 8 miRNAs and inhibited PPS-induced long-term changes of 5 miRNAs, namely miRNA-129-5p, miRNA-379-3p, miRNA-410-3p, miRNA-431 and miRNA-433-3p. These miRNAs are candidates for an *in vivo* manipulation to inhibit epileptogenesis.

## 2. Einleitung

### 2.1. Anfälle und Epilepsien

#### 2.1.1. Definitionen und Klassifikation

Als epileptischen Anfall bezeichnet man vorübergehende Symptome einer abnormalen exzessiven oder synchronen, neuronalen Aktivität im Gehirn (Fisher et al., 2005). Akut symptomatische Anfälle sind Anfälle, die unmittelbar auf eine zerebrale oder systemische Schädigung zurückzuführen und zeitlich an diese gekoppelt sind (Fisher et al., 2014). Spontane epileptische Anfälle treten dagegen unprovziert, also unabhängig von erkennbaren äußeren Einflüssen auf. Das Auftreten eines Anfalls setzt nicht zwangsläufig eine bestehende Epilepsie voraus.

Epilepsie ist ein Sammelbegriff für chronische Zustände, bei denen Patienten spontane, unprovzierte Anfälle erleiden. Laut Definition der „International League against Epilepsy“ (ILAE) besteht eine Epilepsie dann, wenn ein Patient mindestens 2 unprovzierte Anfälle im Abstand von mehr als 24 h erleidet oder wenn ein unprovzierter Anfall auftritt und ein vergleichsweise hohes 10-Jahres-Rezidivrisiko ( $\geq 60\%$ ) besteht. Dieses kann z. B. anhand einer potentiell epileptogenen Läsion im zerebralen Magnetresonanztomogramm (MRT) oder anhand epilepsietypischer Potentiale im Elektroenzephalogramm (EEG) festgestellt werden (Fisher et al., 2014).

Als Status epilepticus (SE) wird ein Zustand bezeichnet, der entweder durch Versagen von anfallsterminierenden Mechanismen oder durch initiierende Mechanismen zu einem abnormal verlängerten Anfall führt (Trinka et al., 2015).

#### 2.1.2. Epidemiologie

Epilepsien gehören zu den häufigsten neurologischen Krankheiten. Etwa 10 % aller Menschen erleiden irgendwann in ihrem Leben mindestens einen akut symptomatischen oder spontanen epileptischen Anfall. Weltweit leiden ca. 50 Millionen Menschen an einer Epilepsie (<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>). Die Inzidenz für Epilepsien wird auf 50/100.000/Jahr geschätzt (Sander, 2003). Die Lebenszeitinzidenz beträgt damit etwa 2-3 %.

### 2.1.2. Allgemeine Pathophysiologie

Laut Epilepsiedefinition liegen einer Epilepsie **gesteigerte Erregbarkeit** und **abnorme Synchronisation** der Hirnaktivität zugrunde.

Die **Erregbarkeit von Neuronen** wird unter anderem beeinflusst durch

- die neuronale Struktur (z. B. Reduktion dendritischen Dornfortsätzen von Neuronen (Swann et al., 2000))
- elektrische Membraneigenschaften (z. B. Reduktion der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (Prince et al., 2012))
- Ausstattung mit Neurotransmitterrezeptoren (z. B. reduzierte Expression von Gamma-Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptoren; erhöhte Expression von Glutamat-gesteuerten AMPA- (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) und NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptoren (Ure und Perassolo, 2000))
- intrazelluläre Prozesse (z. B. Langzeit-Potenzierung (long-term potentiation; LTP; Ben-Ari und Represa, 1990): Verstärkte synaptische Übertragung nach anhaltender Depolarisation der Synapse; aktivitätsabhängige mikroRNAs (miRNAs; Jimenez-Mateos und Henshall, 2013; Rajman et al., 2017))
- Mikroumgebung (z. B. Astrogliose (siehe Punkt 2.2.3), Öffnung der BBB und dadurch Albumin-induzierte TGF-β-Freisetzung und Reduktion von Kaliumströmen (Weissberg et al., 2015))
- Freisetzung exzitatorischer Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren durch Mikroglia (Eyo et al., 2017; kann sowohl die direkte Erregbarkeit von Neuronen beeinflussen, aber auch an Umbauprozessen beteiligt sein).
- 

**Abnorme Synchronisation** kann entstehen aufgrund von:

- Neurodegeneration (kann zur Bildung neuer Synapsen und verstärkter Konnektivität führen, vgl. Absatz 2.2.2)
- Netzwerkmechanismen (z. B. Neuspaltung von Moosfasern, siehe Absatz 2.2.3)
- direkte Erregungsausbreitung (z. B. durch Veränderung von Gap Junctions (Jin and Chen, 2011))
- fehlende Kaliumpufferung durch Astrozyten (siehe Absatz 2.2.3).

### 2.1.3. Klinisches Bild

Bei einer manifesten Epilepsie treten unprovokierte Anfälle auf. Die Klassifikation dieser Anfälle kann anhand unterschiedlicher Kriterien erfolgen und ist in der Literatur nicht einheitlich repräsentiert. Eine Klassifikation, die nur auf der Anfallssemiologie (und nicht auf dem EEG) beruht, wurde 1998 von Lüders (Lüders et al., 1998) vorgeschlagen. Diese Klassifikation beruht darauf, dass klinische Anfallssymptome beim Menschen eine von 4 Kategorien betreffen können: Wahrnehmung, Bewusstsein, Vegetativum und Motorik. Neben den Symptomen auftretender Anfälle leiden Epilepsiepatienten häufig unter Begleiterscheinungen wie Angstzuständen und Depressionen (Ridsdale et al., 2017). Es wurde gezeigt, dass jeder dritte Epilepsiepatient im Laufe seines Lebens psychiatrisch erkrankt (Tellez-Zenteno et al., 2007). Die Mortalität ist gegenüber der Normalbevölkerung 2,6-fach erhöht (Surges und Sander, 2012). Gründe dafür können die Epilepsie verursachenden Faktoren (wie Tumoren), anfallsbedingte Unfälle, SE, erhöhte Suizidrate durch auftretende Depressionen oder „Sudden Unexpected Death in Epilepsy Patients“ (SUDEP), welcher meist durch unkontrollierte Anfälle entsteht, sein (Srinivas und Shah, 2017).

### 2.1.4. Elektroencephalographie (EEG)

Ein EEG misst Veränderungen im elektrischen Feldpotential, welches durch die Dipoleigenschaft von Neuronen generiert wird. Dafür wird die Spannungsdifferenz zwischen je zwei auf der Kopfhaut angebrachten Elektroden gemessen (Oberflächen-EEG). Außerdem gibt es bei Bedarf die Möglichkeit subduraler oder intrazerebraler Ableitungen. Verwendet werden hierzu Gitter- oder Streifenelektroden, die auf den Kortex aufgelegt werden, oder Tiefenelektroden mit jeweils mehreren Kontakten, die z. B. stereotaktisch gesteuert ins Hirngewebe eingebracht werden.

Exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP) bewirken durch einen Kationen-Einstrom in das postsynaptische Neuron ein negatives extrazelluläres Feldpotential, inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSP) bewirken analog durch Anionen-Einstrom ein positives extrazelluläres Feldpotential. Bei synchroner Aktivität mehrerer parallel angeordneter Neuronen summieren sich die negativen Feldpotentiale und werden so als negative Differenz zur Referenzelektrode im EEG sichtbar. Dargestellt wird eine solche Ladungsverschiebung als oberflächennegatives Signal, welches als Spike (bei Dauer bis 80 ms) bzw. Sharp Wave (bei Dauer zwischen 80 und 200 ms) bezeichnet wird. Ein Spike ist oft von einer sogenannten „Slow wave“ gefolgt, welche durch laterale Inhibition entsteht, die aufgrund ihrer Lokalisation im Bereich der Zellkörper als ebenfalls positiver Ausschlag im EEG auftritt. „Spikes“ und „Sharp waves“

treten interiktal (zwischen Anfällen) auf und werden als epilepsietypische Potentiale (ETP) bezeichnet, da sie nur sehr selten bei Gesunden auftreten. Klinisch bleiben interiktale ETP meist stumm; nur bei Einbeziehung des Motorkortex können sie mit kurzen einzelnen Muskelzuckungen (Myoklonien) assoziiert sein. Epileptische Anfälle erscheinen im EEG als rhythmische Aktivität mit einer Evolution, also einer Zu- oder Abnahme von Frequenz und/oder Amplitude sowie räumlicher Ausbreitung.

Beim Video-EEG-Monitoring erfolgt eine EEG-Ableitung und simultane Video-Überwachung über mehrere Tage, um ictale EEG-Signale unter Berücksichtigung der Anfallssemiologie heranzuziehen, um die Anfallsursprungszone zu bestimmen.

## 2.1.5. Prinzipien für die Therapie der Epilepsien

### 2.1.5.1. Medikamente

Die medikamentöse Behandlung von Epilepsien erfolgt mit anfallsunterdrückenden Medikamenten, die aufgrund ihres Wirkmechanismus als Antikonvulsiva bezeichnet werden. Die Wirkung beruht meist auf einer Hemmung exzitatorischer oder einer Verstärkung inhibitorischer Mechanismen.

Dies kann durch eine Potenzierung der Wirkung von GABA erfolgen oder durch eine Hemmung exzitatorischer Signale, z. B. durch verringerte Erregungsweiterleitung, die Hemmung der vesikulären Glutamat-Freisetzung oder die Hemmung von glutamatergen AMPA (Perampanel; Golyala und Kwan 2017; Kwan, Sills, und Brodie 2001) oder NMDA-Rezeptoren (z. B. Felbamate). Glutamat ist der häufigste Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) und wirkt exzitatorisch auf Neuronen, GABA ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS.

Die Wirkung von Antikonvulsiva ist ausschließlich symptomatisch, ein antiepileptogener Effekt wurde bislang nicht nachgewiesen (Löscher und Brandt, 2010; Pitkänen, 2002). Forschungen an neuen Medikamenten mit potentiell antiepileptischen (krankheitsmodifizierenden) Eigenschaften konzentrieren sich unter anderem auf den „*mechanistic Target of Rapamycin*“ (mTor)- Signalweg (Sadowski et al., 2015). mTor wird durch Rapamycin reguliert und kodiert eine Proteinkinase, die in Zellwachstum und Proliferation involviert ist.

Mehr als 30 % aller Epilepsiepatienten werden durch medikamentöse Therapie nicht dauerhaft anfallsfrei. In einer Studie mit 525 Epilepsiepatienten wurden nach erfolgloser Monotherapie nur 13 % durch Umstellung auf ein anderes Antikonvulsivum anfallsfrei (Kwan und Brodie, 2000). Der Einsatz weiterer Antikonvulsiva führte noch seltener (jeweils etwa 3-4 % durch Einnahme eines zweiten bzw. dritten Antikonvulsivums) zu

Anfallsfreiheit. Für die mTLE-HS ist der Anteil der medikamentenresistenten Patienten mit etwa 80 % erheblich höher als bei den meisten anderen Epilepsiesyndromen (Semah et al., 1998). Zusätzlich ist die medikamentöse Behandlung von Epilepsien oft mit Nebenwirkungen verbunden. Aus diesen Gründen ist es wichtig alternative Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln und zu evaluieren.

#### 2.1.5.2. Resektive Epilepsiechirurgie

Patienten, die unzureichend auf Antikonvulsiva reagieren, werden für die Behandlung durch eine resective Hirnoperation in Erwägung gezogen. Durch die chirurgische Entfernung der epileptogenen Zone kann definitionsgemäß Anfallsfreiheit erreicht werden. Liegt z. B. eine mTLE-HS vor, können eine selektive Amygdalahippokampektomie oder eine anteriore Temporallappenresektion vorgenommen werden. Der ideale Kandidat für eine solche Behandlung hat einen positiven MR-Befund, das heißt eine sichtbare epileptogene Läsion (Heinz et al., 1994). Der Anteil der behandelten mTLE-Patienten, der durch eine Operation dauerhaft anfallsfrei wird, wird auf 60-80 % geschätzt (Englot und Chang, 2014; Wieser und ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy, 2004), wobei Anfallsfreiheit unwahrscheinlicher im Falle vieler präoperativer Anfälle ist (Jeha et al., 2006). Allerdings kommt ein großer Anteil der medikamentenresistenten mTLE-Patienten nicht für eine Operation in Frage. Kontraindikationen können ein bilateraler oder multifokaler Anfallsursprung oder ein Anfallsursprung in einem eloquenten (funktionell relevanten) Kortex-Areal sein (Englot und Chang, 2014; Englot et al., 2016; Kwan und Brodie, 2000).

#### 2.1.5.3. Elektrische Neurostimulation

Derzeit sind in Europa und den USA 3 elektrische Stimulationsverfahren zur Epilepsitherapie zugelassen: Vagusnervstimulation, tiefe Hirnstimulation (DBS) der Nuclei anteriores des Thalamus (anterior nucleus of the thalamus; ANT) und responsive (anfallsgetriggerte) Stimulation der Anfallsursprungszone.

##### 2.1.5.3.1 Vagusnervstimulation

Die heute etablierte VNS erfolgt mittels eines implantierten Stimulusgenerators, der über eine Elektrode mit dem Nerv verbunden ist. Die Stimulation erfolgt anfallsunabhängig in Intervallen, z. B. über 30 s alle 5 min. Stromstärke, Frequenz und Einzelimpulsdauer können vom Behandler eingestellt werden. Üblich sind Stimulationsstromstärken bis 2,5 mA. Die VNS als Behandlung bei Epilepsien ist seit 1997 (USA) beziehungsweise 2001 (Europa) zugelassen. Eine randomisierte Doppelblind-Studie mit 196 Patienten zeigte eine Anfallsreduktion um 28 % durch hochfrequente (high frequency, HF) VNS

verglichen mit einer Anfallsreduktion um 15 % durch niedrigfrequente (low frequency, LF) VNS als Kontrollbedingung innerhalb von 3 Monaten (Handforth 1998). Außerdem zeigte eine Metaanalyse bisheriger randomisierter Studien bei 50 % der Patienten eine Anfallsreduktion um mindestens 50 % (50 %-Responderrate, 50%RR) und insgesamt eine mittlere Anfallsreduktion um 45 % (Englot et al., 2011). Die zu erwartenden Nebenwirkungen durch VNS sind dabei geringer als bei der Behandlung mit Antikonvulsiva (Giordano et al., 2017; Révész et al., 2016). Die häufigsten Nebenwirkungen sind Husten, Halsschmerzen und Heiserkeit. Diese sind meist stimulationsbedingt und nehmen mit der Zeit ab (Ekmekçi und Kaptan, 2017).

#### 2.1.5.3.2 Tiefe Hirnstimulation

##### Geschichte der tiefen Hirnstimulation

Erste Versuche mit elektrischer Kortex-Stimulationen bei Hunden wurden 1870 von Gustav Fritsch (1838–1927) und Eduard Hitzig (1838–1907) durchgeführt (Carlson und Devinsky, 2009). Dabei wurde gezeigt, dass die elektrische Stimulation spezifischer Areale Muskelkontraktionen evoziert. Die erste Hirnstimulation am Menschen wurde 1874 von Robert Bartholow durchgeführt (Bartholow R., 1874). Er führte eine Stimulation des Kortex und der Hirnhäute durch, woraufhin die Patientin einen SE entwickelte, ins Koma fiel und wenige Tage später verstarb. Daraufhin wurden zunächst keine Hirnstimulationen an Menschen mehr durchgeführt.

Ab 1963 wurden die Hirnstimulationen des Nucleus subthalamicus erstmals erfolgreich zur Behandlung von Bewegungsstörungen eingesetzt (Andy et al., 1963), woraufhin die Hirnstimulation auch zur Behandlung von Epilepsien wieder in den Fokus der Forschung rückte. Zunächst wurde eine hochfrequente Stimulation (high frequency stimulation, HFS) des Cerebellums getestet (Cooper et al., 1973). Die Rationale der Stimulation des Cerebellums waren die Projektion zu motorischen Hirnarealen sowie der inhibitorische Output des Cerebellums (Klinger und Mittal, 2016). Ein Aspekt, der dabei außer Acht gelassen wurde, ist, dass der Kortex des Cerebellums keinen inhibitorischen Output zu motorischen Arealen hat, sondern eben diesen Output der hemmenden Purkinjezellen im cerebellaren Kern inhibiert. Zunächst wurde eine erfolgreiche Fallserie zur Cerebellum-Simulation bei 32 Epilepsiepatienten publiziert (Cooper et al., 1976). Hier wurde eine Anfallsreduktion von über 50 % bei 18 Patienten gemessen (50% RR: 56 %). Auch 11 weitere offene und nicht-randomisierte Studien zur Cerebellum-Stimulation führten zu positiven Ergebnissen. Später wurden allerdings 2 verblindete Studien durchgeführt, in denen kein signifikanter Effekt der Cerebellum-Stimulation bei 17 Patienten gemessen wurde (Van Buren et al., 1978; Wright et al., 1984).

2010 führte die „SANTE“ Studie zur Zulassung der Stimulation der ANT zur Epilepsitherapie in Europa, Australien und Kanada (Fisher et al., 2010). Dabei wurde zunächst während einer 3monatigen verblindeten Phase die eine Hälfte der Patienten stimuliert. Diese hatten im letzten Monat der verblindeten Stimulation eine 29 % höhere Reduktion der Anfallsfrequenz als unstimulierte Kontrollen. Anschließend erhielten alle Patienten die ANT-Stimulation. Nach 2 Jahren war im Median eine 56 %ige Anfallsreduktion zu messen, 54 % der behandelten Patienten erfuhren eine Anfallsreduktion von mehr als 50 %. Nach 5 Jahren wurde eine 69 %ige mediane Anfallsreduktion und eine 50%RR von 68 % gemessen (Salanova et al., 2015). Der ANT ist Teil des Papez-Kreislaufs und wird typischerweise mit folgenden Parametern stimuliert: 145 Hz, 5 V, 90 µs Pulsdauer, 1 min on, 1 min off.

Im Jahr 2013 wurde die responsive Neurostimulation zur Behandlung refraktärer Epilepsien in den USA zugelassen. Hierbei wird im vermuteten Bereich der epileptogenen Zone dauerhaft EEG mittels bis zu 2 subduraler oder Tiefenelektroden abgeleitet und kontinuierlich in Echtzeit durch einen Computeralgorithmus evaluiert. Bei tatsächlicher oder vermeintlicher Detektion eines Anfallsmusters im EEG wird die betreffende Elektrode kurz elektrisch stimuliert, um den Anfall zu unterbrechen. Durch die responsive Stimulation sollen der Energieverbrauch der Stimulationsgeräte reduziert und negative Effekte wie eine Habituation an die Langzeitstimulation sowie Nebenwirkungen einer Dauerstimulation vermieden werden (Liu et al., 2013). Problematisch ist bislang die Umsetzung der Anfallserkennung, da die verwendeten Algorithmen >99,9% falsch-positive Ergebnisse erzielen und so zahlreiche Stimulationsphasen auch ohne das Auftreten eines Anfalls gestartet werden. Die Methode führte in einer randomisierten Doppelblind-Studie mit 191 Patienten nach einem Jahr zu einer medianen Anfallsreduktion um 44 % und nach zwei Jahren um 53 % (Heck et al., 2014).

#### Potentielle Wirkmechanismen der tiefen Hirnstimulation

Die Wirkmechanismen der DBS sind bislang unbekannt, weshalb Protokolle und Stimulationsziele zurzeit hauptsächlich auf empirischen Daten beruhen. Man kann zwischen akuten (anfallsunterbrechenden) und neuromodulativen Effekten (als Langzeitfolge) unterscheiden. Effekte können direkt elektrisch oder über molekularbiologische Mechanismen vermittelt sein. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über mögliche Wirkmechanismen der DBS.



Tabelle 1: Mögliche Wirkmechanismen der DBS

	Elektrisch	Molekularbiologisch
Akut	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ DC-Shift (Velasco et al., 2000)</li> <li>➤ Depolarisationsblock (Jensen und Durand, 2009)</li> <li>➤ (De-) Synchronisation (Montgomery und Baker, 2000).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ionenverschiebungen, z. B. durch extrazellulären <math>K^+</math>-Anstieg (Lian et al., 2003)</li> <li>➤ Transmitterfreisetzung (z. B. GABA-vermittelte Inhibition; Urbano et al., 2002).</li> <li>➤ Neuroprotektion, z. B. durch reduzierte Apoptose (Chen et al., 2014).</li> </ul>
Chronisch	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Netzwerkeffekte durch strukturellen Umbau (Koubeissi et al., 2013)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Wachstumsfaktoren (Gondard et al., 2015)</li> <li>➤ Zytokine (Amorim et al., 2015)</li> <li>➤ Langzeit-Depression (Albensi et al., 2004; Schiller und Bankirer, 2007; Toprani und Durand, 2013)</li> <li>➤ miRNA (Soreq et al., 2013)</li> <li>➤ Rezeptorexpression; z. B. GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren (Cuéllar-Herrera et al., 2004),</li> <li>➤ Erhöhung des Adenosinlevels (Boison, 2005)</li> </ul>

### Stimulationsziele und Paradigmen

Experimentelle Studien zur Wirkung der DBS führen häufig trotz gleicher Stimulationsziele zu unterschiedlichen Ergebnissen. Dies kann unter anderem an der Vielzahl von Variablen liegen, die zwischen den Studien variieren. Parameter, die zwischen den angewandten Stimulationsparadigmen variieren können, umfassen:

- Frequenz
- Stromstärke/Spannung
- Pulsdauer
- „Train“-Dauer
- Wellenform (z. B. sinusoidal vs. Rechteckimpulse)
- „bipolar“ (Stimulationselektroden sind direkt benachbart) vs. „unipolar“ (Eine Stimulationselektrode ist weiter von der Zielregion entfernt)
- biphasisch vs. monophasisch
- intermittierend vs. kontinuierlich
- Open loop vs. Closed loop (responsiv)
- Verteilung der Stimulationspulse (z. B. Poisson- vs. regelmäßige Verteilung)

Als Stimulationsziele kommen Faserstrukturen als Eingang oder Ausgang der epileptogenen Zone, hier der PP und die Fimbria-Fornix-Formation (FF), sowie die epileptogene Zone selbst, hier der Hippokampus, in Frage. Neben der FF enthält die VHC efferente Axone des Hippokampus, die diesen mit parahippokampalen Neuronen verbinden und so potentielle Ausbreitungsstrukturen für Anfallsaktivität und daher auch mögliche Strukturen zur Anfallsunterdrückung mittels DBS darstellen. Die direkte Stimulation weißer Substanz ist potentiell effektiver als die Stimulation von Kerngebieten, da ausschließlich Axone stimuliert werden, die aufgrund einer hohen Dichte an spannungsgesteuerten Na<sup>+</sup>-Kanälen einen niedrigeren Erregungsschwellenwert haben als die Somata (Khan et al., 2009). Außerdem ist dabei eine niedrigere Stromstärke als bei direkter Stimulation der epileptogenen Zone nötig, da der Durchmesser der zu stimulierenden Region meist geringer ist und nur exzitatorische Komponenten des Kreislaufs aktiviert werden (Stephani und Koubeissi, 2015). Durch Stimulation der weißen Substanz kann entweder orthodrom (in Richtung der Synapse) oder antidrom (in Richtung des Somas) die epileptogene Zone adressiert werden. Es wird vermutet, dass die Stimulation von Fasertrakten, welche direkt mit der epileptogenen Zone verbunden sind, die Ausbreitung von Anfällen unterdrücken kann (Kellinghaus et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass bei mTLE-Patienten Veränderungen in der weißen Substanz (unter anderem des Fornix) auftreten, wie z. B. die Wallersche Neurodegeneration. Diese Veränderungen können durch temporale Lobektomie reduziert werden (Pustina et al., 2014; Winston et al., 2013). Das legt nahe, dass auch eine Stimulation von weißer Substanz antiepileptogen wirken kann.

In dem hier beschriebenen Experiment wurden vier verschiedene Stimulationsziele getestet:

- Die ventrale hippokampale Kommissur (ventral hippocampal commissure, VHC):

Im menschlichen Gehirn gibt es keine VHC, allerdings besteht eine dorsale Kommissur der beiden Hippokampi. Zur DBS dieser Struktur gibt es bisher keine veröffentlichten Studien. Die DBS der VHC war in verschiedenen Tiermodellen antikonvulsiv und antiepileptisch wirksam (Kile et al., 2010; Rashid et al., 2012).

- Die Fimbria/Fornix-Formation (FF):

Die Stimulation der FF wurde kürzlich bei 11 Patienten mit mTLE während eines invasiven Video-EEG-Monitorings getestet (Koubeissi et al., 2013). In der Studie wurde LFS (5 Hz, 0,2 ms, 8 mA) für je 4 Stunden täglich angewandt. Die Behandlungsdauer variierte zwischen 1 und 11 Tagen. An den beiden darauffolgenden Tagen wurde eine Anfallsreduktion von 92 % festgestellt. Des Weiteren wurde eine Reduktion

hippokampaler Spike-Aktivität gemessen. Es gibt jedoch bisher keine Langzeit-Studien. Für eine valide Beurteilung der Wirksamkeit der FF-Stimulation wäre außerdem eine randomisierte Doppelblind-Studie erforderlich.

➤ Der Tractus perforans (perforant pathway, PP):

Der PP beinhaltet die meisten Eingangsneuronen des Hippokampus und könnte so die Erregbarkeit des Hippokampus beeinflussen, so dass eine elektrische Stimulation mit einem geeigneten Paradigma pathologische Oszillationen im limbischen System unterbrechen könnte. Der PP als Ziel für die DBS wurde 2002 in Ratten nach unilateraler hippocampaler Kainsäure (KA)-Injektion getestet (Bragin et al., 2002a). Eine PPS, die stark genug war, um elektrische Nachentladungen (After-discharges) im EEG zu induzieren, reduzierte die Anfallsfrequenz. Außerdem wurde gezeigt, dass eine responsive Stimulation des PP Anfälle nach systemischer oder lokaler Injektion von Pilocarpin unterbrechen kann (Cymerblit-Sabba et al., 2013). Der PP als Ziel für eine DBS wurde bislang nicht bei menschlicher mTLE validiert.

➤ Der Gyrus dentatus (dentate gyrus, DG):

Eine gezielte und isolierte Stimulation des DG wurde bislang nicht durchgeführt. Allerdings liegen einige Studien vor, bei denen der Hippokampus insgesamt (und damit auch der DG) stimuliert wurde. In Hirnschnitten wurde gezeigt, dass epileptiforme Entladungen durch Stimulation der Schaffer-Kollateralen mit 1 Hz oder 100 Hz abgeschwächt werden kann (Albensi et al., 2004). In Tierversuchen zur HFS des Hippokampus wurde eine reduzierte Anfallsfrequenz sowie eine verringerte Neurodegeneration nach KA-induziertem SE bei Makaken festgestellt (Chen et al., 2014). LFS des Hippokampus (CA3) führte in einem Amygdala-Kindling-Stimulationsmodell in Ratten zu reduzierter Anzahl und Dauer generalisierter Anfälle (Sun et al., 2010; Zhang et al., 2009). Im Amygdala-Kindling Modell wurden außerdem ein höherer After-Discharge Schwellenwert und eine längere After-Discharge-Latenz während HFS des Hippokampus festgestellt, welche allerdings nach der Stimulation auf das Baseline-Level zurück ging (Wyckhuys et al., 2010).

Bragin et al. (2002) hingegen stellten nach 200 Hz Stimulation des Hippokampus keine Reduktion der Anzahl spontaner Anfälle nach unilateral intrahippokampal injiziertem KA bei Ratten fest.

Klinische Studien berichten ebenfalls sehr unterschiedliche Ergebnisse der Hippokampus-Stimulation mit Frequenzen zwischen 130 und 200 Hz, die von Anfallsfreiheit bis unveränderter Anfallsfrequenz reichen. 1976 wurde beschrieben, dass

die Hippokampus-Stimulation zu einer reduzierten Anfallsfrequenz bei 4 Patienten mit generalisierten tonisch-klonischen oder fokalen Anfällen führte (Sramka et al., 1976). Im Jahre 2000 wurde bei 7 von 10 getesteten Patienten eine reduzierte Anfallsfrequenz und verringertes Auftreten interiktaler Spikes nach hochfrequenter Hippokampus-Stimulation (biphasische 450  $\mu$ s Pulse mit 200-400  $\mu$ A und 130 Hz) gemessen (Velasco et al., 2000). In einer weiteren Studie mit 9 Patienten wurde eine Anfallsreduktion durch HFS bei allen Patienten gemessen, allerdings war die Anfallsreduktion bei Patienten mit HS geringer (50-70 %) als bei Patienten ohne positiven MRT-Befund (90 %; Velasco et al., 2007). Eine Studie an 8 Patienten zeigte vollständige Anfallsfreiheit nach HFS des Hippokampus bei 2 Patienten und eine Anfallsreduktion um 65-75 % bei 4 Patienten; allerdings erfuhren 2 weitere Patienten keine Anfallsreduktion (Boëx et al., 2011). Cukiert et al. (2014) berichteten über eine Anfallsreduktion zwischen 66 und 100 % bei 7 von 9 Patienten nach hippokampaler HFS (300  $\mu$ s Pulse, 1-3,5 V, 130 Hz); 2 Patienten erfuhren keine Anfallsreduktion durch die Behandlung. Eine weitere Studie beschreibt eine Anfallsreduktion um  $\geq 90$  % bei 6 Patienten, um 40-70 % bei 3 Patienten und um  $<30$  % bei 2 Patienten (Vonck et al., 2012).

## 2.2. Mesiale Temporallappenepilepsie

### 2.2.1. Epidemiologie und klinisches Bild

Die mTLE ist die häufigste fokale Form der Epilepsie bei Erwachsenen (Duncan und Sagar, 1987; Engel, 1996; Téllez-Zenteno und Hernández-Ronquillo, 2012). Anfälle entstehen dabei in Strukturen des mesialen Temporallappens, wie dem Hippokampus und der Amygdala. Die Anfälle können fokal bleiben oder sekundär generalisieren. Fokale Anfälle beginnen im Falle der mTLE häufig mit epigastrischen Auren, die als aufsteigendes Übelkeitsgefühl oder unangenehme Empfindung in der Magengegend beschrieben werden. Häufig sind außerdem gustatorische und psychische Auren (Kruse, 1990). Anschließend entstehen häufig orale Automatismen und generalisierte tonisch-klonische Anfälle.

Die mTLE-HS ist seit 2010 von der ILAE als unverwechselbare Konstellation eingestuft, da sie sich durch eine charakteristische Anfallssemiologie, typische EEG-Befunde und insbesondere die Entwicklung einer im MRT sichtbaren HS von anderen Epilepsiesyndromen abgrenzen lässt. Ursache der mTLE ist vermutlich häufig ein initiales hirnschädigendes Ereignis (IPI: initial precipitating injury). Dies kann z. B. eine zerebrale Ischämie, ein komplizierter Fieberkrampf oder ein Schädel-Hirn-Trauma sein. Nach einer Latenzperiode, die Monate bis Jahre andauern kann, treten unprovizierte, spontane Anfälle auf.

### 2.2.2. Anatomie

Der Hippokampus befindet sich im Telencephalon und ist Teil des sogenannten Papez-Kreises (Papez, 1995), der über den Fornix zum Corpus mamillare und dann zu den ANT projiziert. Von dort erfolgt die Erregungsleitung über den Gyrus cinguli und den parahippokampalen Kortex zum entorhinalen Kortex und dann über den PP wieder zum Hippokampus. Der Papez-Kreis ist Teil des limbischen Systems.

Der Hippokampus gliedert sich in die Regionen des Cornu ammonis mit den Subfeldern CA1 bis CA3, den DG und dessen Hilus (früher CA4), das Subiculum, Prä- und Parasubiculum und den entorhinalen Kortex. Die hauptsächliche Erregungsweiterleitung führt vom entorhinalen Kortex über den PP zu den Körnerzellen des DG. Die Axone der Körnerzellen, Moosfasern genannt, projizieren zu den Pyramidenzellen der CA3-Region sowie den Mooszellen des Hilus. Deren Axone verlassen den Hippokampus über den Fornix oder führen als Schaffer-Kollateralen zu den Dendriten der CA1-Region. Die CA1-Neurone projizieren zurück zum entorhinalen Kortex (Amaral und Witter, 1989).

### 2.2.3. Pathophysiologie

Histopathologisch tritt bei der mTLE meist (bei etwa 2/3 der Betroffenen) eine HS auf (Blümcke et al., 2017). Hierbei kommt es zu einer Neurodegeneration in den Bereichen CA1, CA3 und im Hilus des DG. Die ILAE klassifiziert verschiedene Subtypen dieses Degenerationsmusters. Die häufigste und am besten untersuchte Form wird als ILAE Klasse I HS bezeichnet und beinhaltet einen etwa gleich stark ausgeprägten Neuronenverlust in CA1 und dem Hilus des DG. Auch die Amygdala und der entorhinale Kortex können von der Neurodegeneration betroffen sein. Die Pyramidenzellen der CA2-Region sind nicht Teil des Papez-Kreises und bleiben bei der Entstehung einer HS weitgehend unbeschädigt. Die Neurodegeneration kann unter anderem durch exzitatorische Prozesse aufgrund von erhöhtem Glutamat-gesteuertem Calcium-Einstrom durch starke Depolarisation aber auch durch Entzündungsmechanismen induziert werden (Aronica et al., 2017). Wie der Verlust exzitatorischer Neuronen zur Übererregbarkeit eines Netzwerkes führen kann, ist nicht geklärt. Der Verlust von Neuronen könnte dazu führen, dass die präsynaptische Zelle neue Verbindungen zu anderen Neuronen aufbaut, wodurch sich die Konnektivität erhöhen könnte.

Zusätzliche Merkmale der HS sind ein reduziertes Volumen des Hippokampus sowie eine Dispersion der Körnerzellschicht (Houser, 1990) und eine Neuspaltung der Moosfasern (Represa et al., 1993). Die Neuspaltung von Moosfasern führt zu einer erhöhten Konnektivität von Körnerzellen des DG, was eine abnorme Synchronisation

dieser Zellen zur Folge haben kann. Die Rolle der Dispersion der Körnerzellschicht in der Pathologie der HS ist unklar. Induziert werden könnte diese z. B. durch Störungen im Wirkmechanismus von Reelin, welches als extrazelluläres Matrixprotein an der Entwicklung kortikaler Schichten beteiligt ist (Frotscher et al., 2003). Außerdem wird eine verringerte inhibitorische Wirkung verschiedener Neuropeptide als Mechanismus vermutet (Thom, 2014).

Außerdem kommt es zu einer Vermehrung von Gliazellen wie Astrozyten, was als Astrogliose bezeichnet wird (Blümcke et al., 2002). Eine Astrogliose kann zu einer Überexpression des Enzyms Adenosinkinase und dadurch zu einer reduzierten Adenosin-Expression und Übererregbarkeit von Neuronen in der betroffenen Region führen (Boison, 2008). Eine verminderte  $K^+$ -Aufnahme durch Gliazellen kann ebenfalls an der Entstehung einer Übererregbarkeit neuronaler Strukturen beteiligt sein (Pollen and Trachtenberg, 1970), da eine erhöhte extrazelluläre Kalium-Konzentration zur Depolarisation der Membranspannung führt. Außerdem wurde eine verlängerte Depolarisation von Astrozyten (Schröder et al., 2000) sowie die erhöhte Expression ionotroper Glutamat-Rezeptoren (Seifert et al., 2004) und Glutamat-Transporter (Proper et al., 2002) bei der HS nachgewiesen.

## 2.3. Krankheitsmodelle

### 2.3.1 Notwendigkeit von Modellen

Die Verwendung von Tiermodellen zur Untersuchung der Pathomechanismen der mTLE-HS ist aus mehreren Gründen erforderlich:

- 1) Beim Menschen verläuft die Entwicklung der mTLE-HS (Epileptogenese) klinisch stumm und kann mangels geeigneter Biomarker noch nicht diagnostiziert werden. Daher kann beim Menschen nur eine bereits manifeste Epilepsie untersucht werden.
- 2) Zwar kann man hippokampales Gewebe im Anschluss an einen epilepsiechirurgischen Eingriff untersuchen, aber es steht kein vergleichbares Kontrollgewebe zur Verfügung, da gesunde Hippokampi nicht reseziert werden. Eine Untersuchung von Post-mortem-Gewebe wiederum ist mit anderen spezifischen Problemen behaftet (Post-mortem-Veränderungen, Beeinträchtigungen des Gewebes durch andere Erkrankungen des Verstorbenen).

- 3) Viele invasive Untersuchungsmethoden sind aus ethischen Gründen nicht beim Menschen durchführbar.
- 4) Da Epilepsien Netzwerkerkrankungen sind, kann eine Modellierung mittels Einzelzelluntersuchungen oder Gewebeschnitten nur Teilaspekte abbilden. Für eine valide Untersuchung systemischer Mechanismen ist eine (weitgehend) intakte Hirnstruktur erforderlich.

### 2.3.2. Modelle

Im Lauf der letzten Jahrzehnte wurden zahlreiche Modelle entwickelt, die verschiedene Aspekte der Erkrankung nachbilden. Hierzu gehören Computermodelle, Einzelzelluntersuchungen, Zellkulturen und Gewebeschnitte sowie Tiermodelle für akute Anfälle und für Epilepsien. Die wichtigsten Tiermodelle werden hier dargestellt, wobei besonders auf die induzierten Epilepsiemodelle bei Tieren eingegangen wird.

Akute Anfälle in Tiermodellen können z. B. durch die lokale oder systemische Injektion von chemokonvulsiven Substanzen oder durch Elektrostimulation über Cornealelektroden hervorgerufen werden. Studien an diesen Modellen haben zu verschiedenen Hypothesen über Anfallsaktivitäten geführt, wie Veränderungen in der neuronalen Erregbarkeit durch Änderungen im extrazellulären Milieu oder der Dysbalance zwischen Erregung und Inhibition. Allerdings können aus diesen Studien keine Erkenntnisse zur Entstehung spontaner Anfällen bei manifestierter Epilepsie hergeleitet werden (Engel und Schwarzkron, 2006).

Die wichtigsten Epilepsiemodelle lassen sich unterteilen in genetische Modelle (für genetische Epilepsiesyndrome), chemokonvulsive Modelle (systemisch oder lokal) und elektrische Stimulationsmodelle. Da genetische Epilepsiemodelle für die Forschung der nicht genetisch verursachten mTLE-HS nicht geeignet sind, werden hier die wichtigsten induzierten Epilepsiemodelle erläutert. Die meisten Tiermodelle für Epilepsien beruhen auf dem Auslösen eines SE. Dieser Zustand kann im Tiermodell durch das Injizieren chemokonvulsiver Substanzen oder durch elektrische Stimulation induziert werden. Die chemokonvulsiven Substanzen Pilocarpin, ein Agonist des muskarinischen Acetylcholin-Rezeptors, und Kainsäure (KA), ein Strukturanalogon des Glutamats, sind die am häufigsten genutzten Substanzen zur Induktion eines SE. Weitere verwendete Chemokonvulsiva sind unter anderem Tetanustoxin, Strychnin und Pentylenetetrazol (PTZ). Die systemische Injektion chemokonvulsiver Substanzen induziert neben der hippokampalen Neurodegeneration erhebliche extrahippokampale Schäden, die in der menschliche mTLE nur begrenzt auftreten (Thom, 2014). Dies kann minimiert werden, indem die Injektion unilateral in eine mesiale Hirnregion wie die Amygdala oder den

Hippokampus erfolgt. Das Unterbrechen des SE kann mittels Benzodiazepinen erfolgen und ist notwendig, da ein SE ab einer Dauer von >30 min häufig nicht von selbst sistiert und potentiell tödlich ist. Nach einer Latenzphase entwickeln sich spontane Anfälle. Bei Patienten ist das Auftreten eines SE als Ursache für die Epileptogenese allerdings eher die Ausnahme als die Regel (Herman, 2002). Außerdem haben die Dauer, der Schweregrad und die Termination des SE im Tiermodell erheblichen Einfluss auf den Verlauf der Epileptogenese. Das Beenden eines SE kann unter Umständen nur die klinischen Symptome betreffen, während elektroenzephalographisch weiterhin Statusaktivität variabler Dauer nachweisbar ist, so dass es im Tiermodell zu unterschiedlich stark ausgeprägter Schädigung des Hippokampus kommen kann (Löscher und Brandt, 2010). Daher wurden Tiermodelle entwickelt, die das Auftreten eines SE vermeiden.

Eine Sonderstellung unter den Tiermodellen bildet das sogenannte Kindling, welches zwar nach dem üblichen Protokoll keine spontanen Anfälle hervorruft, aber trotzdem als Modell für die Epileptogenese eingesetzt wird. Hierbei führt wiederholte elektrische Stimulation, z. B. der Amygdala, zunächst zur Entstehung subkonvulsiver, fokaler Anfälle. Durch Wiederholen der Stimulation entstehen länger anhaltende und stärkere Anfälle. Die meisten Kindling-Studien berichten nicht von einem nachgewiesenen Neuronenverlust oder dem Auftreten einer HS (Morimoto et al., 2004). Außerdem kommt es beim klassischen Kindling nicht zur Entstehung spontaner Anfälle. Eine Ausnahme bildet das sogenannte „Overkindling“. Dabei wird die Stimulation über mehrere Monate wiederholt, wonach etwa die Hälfte der Ratten spontane Anfälle entwickelt (McIntyre et al., 2002). Dieser Vorgang ist technisch sehr aufwändig und kostspielig. Aufgrund der fehlenden Entwicklung spontaner Anfälle im klassischen Kindling ist das Modell für Untersuchungen von Epileptogenese-Prozessen nur bedingt geeignet. Außerdem ist unklar, welche Art von epileptogenem IPI das Kindling modellieren soll, da bei der menschlichen mTLE von einem einzigen IPI als Auslöser der Epileptogenese ausgegangen wird. Entgegen dieser Annahme wurde allerdings auch die Hypothese aufgestellt, dass die Latenzphase nach dem IPI von initialen unterschwelligen, fokalen Anfällen gekennzeichnet ist, welche erst nach der Latenzphase klinisch sichtbar werden und weiter fortschreiten, was durch einen Kindling-Prozess modelliert werden könnte (Sloviter, 2017).

Eine Schwierigkeit in allen verwendeten Tiermodellen ist die hohe Variabilität der Anfallsfrequenz, die häufig zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führt (Löscher und Brandt, 2010). Um eine möglichst zuverlässige Aussage über die



Anfallsfrequenz machen zu können, ist daher eine lange Beobachtungszeit der Tiere nach Auslösen der Epileptogenese von Vorteil.

### 2.3.3. Anforderungen an ein valides mTLE-HS-Modell

Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zur mTLE-HS bei Patienten zu gewährleisten, sollte ein Modell möglichst viele Kriterien der Krankheit nachbilden. Eine mTLE wird durch ein IPI ausgelöst, welches sich im Tiermodelle z. B. durch elektrische Stimulation oder Injektion chemokonvulsiver Substanzen modellieren lässt. Ein weiteres Kriterium für ein valides Tiermodell ist eine zuverlässige Latenzperiode. Außerdem sollte die Anfallsfrequenz der untersuchten Tiere nach der Latenzperiode in der gleichen Größenordnung wie beim Menschen liegen. Ein weiterer wichtiger Aspekt zur Modellierung der mTLE-HS ist das histopathologische Auftreten einer HS und eine möglichst geringe extrahippokampale Neurodegeneration. Um eine sehr große Zahl an benötigten Versuchstieren zu vermeiden, ist außerdem eine niedrige Mortalität des verwendeten Modells von Vorteil.

### 2.3.4. Das „30-30-8“-PPS Modell

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell beruht auf der wiederholten elektrischen Stimulation des Tractus perforans (Perforant Pathway Stimulation; PPS) der Ratte nach einem speziellen Paradigma. Die PPS führt bei hinreichender Intensität unmittelbar nach Beginn der Stimulation zu Anfällen, die zunächst nach Beenden der Stimulation sistieren. Dauert die PPS länger als ca. 30 min, sistieren die Anfälle nach Beendigung der Stimulation nicht mehr spontan. Vielmehr entsteht ein sich selbst aufrechterhaltender SE (self sustained SE, SSSE). Ab ca. 40 min Stimulationsdauer kommt es zu hippokampaler Neurodegeneration (Norwood et al., 2011). Besteht der SSSE über einige Stunden fort und wird dann medikamentös (z. B. durch Benzodiazepine wie Lorazepam oder Diazepam) durchbrochen, entwickeln die Tiere nach einigen Tagen spontane Anfälle. Histologisch findet sich allerdings keine HS vom ILAE Typ 1, sondern eine Neurodegeneration vorwiegend im Hilus des DG, deutlich geringer in CA3 und CA1 sowie extrahippokampal (Neokortex, Thalamus; Bumanglag und Sloviter, 2008). Um die Ausbildung einer klassischen HS durch PPS zu induzieren, ist eine Stimulationsdauer von etwa 8 h nötig (Norwood et al., 2010). Eine 8stündige PPS ist allerdings wegen des lang andauernden SE mit einer extrem hohen Mortalität assoziiert und kann daher nicht isoliert durchgeführt werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein spezielles Stimulationsparadigma entwickelt: Eine Präkonditionierung der Tiere durch 2malige 30minütige PPS im Abstand von 24 h (Tage 1+2) führt durch bislang kaum verstandene Mechanismen zur Entstehung einer

epileptischen Toleranz (ET). Wird anschließend (Tag 3) erneut eine PPS vorgenommen, entwickeln die Tiere während der Stimulation keinen SE mehr. Daher ist nun eine 8stündige PPS ohne relevante Mortalität möglich. Durch die 8 h PPS werden zwar akut symptomatische Anfälle ausgelöst, die jedoch mit dem Ende der PPS sistieren. Eine Anfallstermination mittels Lorazepam ist nicht notwendig. In seltenen Fällen, in welchen die Anfallstermination nicht selbstständig abläuft, kann die bestehende Anfallsaktivität mittels kurzer Isofluran-Inhalationsnarkose unterbrochen werden. Die Tatsache, dass keine SE-terminierende Lorazepamgabe notwendig ist, macht das Modell gegenüber dem klassischen PPS Modell, welches auf einer 3-stündigen PPS beruht, valider, da die Variabilität zwischen den Versuchstieren verringert wird. Außerdem ist ein SE bei Menschen ein seltener Auslöser für die Epileptogenese; daher ist es von Vorteil, das Auslösen dieses Zustands im Tiermodell zu vermeiden. Weiterhin weist das sogenannte 30-30-8-PPS Modell durch das Ausbleiben eines SE eine geringe Mortalität der Versuchstiere auf (Norwood et al., 2010).

Nach einer Latenzperiode von 12 bis 35 Tagen bildet sich eine mTLE-HS mit spontanen Anfällen. Eine kontinuierliche EEG-Ableitung aus dem DG ermöglicht die Anfallsdetektion. Das Modell bildet sowohl den Krankheitsverlauf als auch die Histopathologie der mTLE-HS nach. Histopathologisch entwickelt sich ein ausgeprägter Verlust von Neuronen in den Regionen CA1 und CA3 sowie im Hilus des DG, was den Merkmalen der HS ILAE Typ 1 beim Menschen entspricht (Norwood et al., 2010). Weitere Untersuchungen mittels RNA-Sequenzierung an dem genannten Modell haben eine Regulation verschiedener mRNAs im DG gezeigt, die hauptsächlich für Proteine kodieren, die in Entzündungsprozesse, Axonenführung sowie Calcium-Signalwege involviert sind. Weitere regulierte Proteine wurden im Zusammenhang mit synaptischer Funktion, neuronaler elektrischer Aktivität und Neuropeptiden ausgemacht (Vieira et al., 2016).

*Tabelle 2: Vergleich der humanen mTLE-HS und des 30-30-8-PPS Modells bei Ratten bezüglich typischer Charakteristika der Krankheit.*

	mTLE-HS beim Menschen	Rattenmodell PPS 30-30-8
IPI	(☑)	☑
Latenzperiode	☑ (10-15 % der Lebenszeit)	☑ (3-10 % der Lebenszeit)
Hippokampussklerose	☑	☑
Temporalen Anfallsursprung	☑	☑
Anfallsfrequenz	3/Woche	3,5 ± 1,7/Woche (zunehmend)
Unilaterale Pathologie	(☑)	☒

Das verwendete 30-30-8-PPS Modell bildet die meisten der unter 2.3.4 beschriebenen Aspekte einer mTLE-HS nach. Das IPI wird in dem verwendeten Modell durch die 8 h Stimulation des PP modelliert. Eine Latenzperiode von 12 bis 35 Tagen ist vorhanden, was das Tiermodell zum einen vergleichbar mit der menschlichen mTLE-HS macht und außerdem eine Untersuchung von Epileptogeneseprozessen ohne eine bereits manifeste Epilepsie ermöglicht. Außerdem kann durch eine Intervention während der stummen Latenzperiode eine antiepileptogene Wirksamkeiten von Behandlungen getestet werden. Das häufig verwendete intraamygdaläre KA Modell hingegen führt zu einer Latenzperiode von nur 3 bis 4 Tagen, systemisches Pilocarpin induziert spontane Anfälle nach Tagen oder Wochen mit einer variablen Latenz. Ein weiterer Vorteil einer durch elektrische Stimulation induzierten Epileptogenese ist die Möglichkeit, molekulare und zelluläre Veränderungen zu untersuchen, ohne einen möglichen Effekt durch das Injizieren chemokonvulsiver Substanzen hervorzurufen. Histopathologisch ist das verwendete Modell ebenfalls gut vergleichbar mit der menschlichen mTLE, da eine typische HS auftritt und im Gegensatz zu Modellen die auf systemisch verabreichten Chemokonvulsiva beruhen keine extrahippokampalen Schäden auftreten. Anfälle entstehen im Temporallappen und treten im Durchschnitt über 3 Monate etwa  $3,5 \pm 1,7$  pro Woche auf, was ebenfalls vergleichbar mit der menschlichen mTLE-HS ist. Chemokonvulsiva führen dagegen zu mehreren Anfällen pro Tag, was zwar einen Effekt auf die Anfallsfrequenz leichter erkennen lässt, aber die Vergleichbarkeit zur mTLE-HS schmälert. Ein Nachteil des 30-30-8-PPS Modells ist die Zeit- und Kostenaufwändigkeit des Modells. Durch die lange Latenzperiode und die Vergleichsweise geringe Anfallsfrequenz sowie zeitaufwändige Operationen und Stimulationen können weniger Tiere in kurzer Zeit untersucht werden, als beispielsweise bei Verwendung eines chemokonvulsiv induzierten Modells.

## 2.4. MikroRNAs

### 2.4.1. Grundlagen

MiRNAs sind einzelsträngige Ribonukleinsäuren (ribonucleic acids, RNA), die aus 19 bis 25 Nukleotiden bestehen. Sie regulieren posttranskriptional den Proteinlevel, indem sie die Translation hemmen oder zum Abbau von messengerRNA (mRNA) führen. Die erste miRNA wurde 1993 in *Ceanorhabditis elegans* als kurze Sequenz komplementär zur lin14 mRNA entdeckt, welche eine Rolle in der postembryonale Entwicklung spielt (Lee et al., 1993). In den darauffolgenden Jahren wurde entdeckt, dass miRNAs in nahezu alle Prozesse in Metazoen involviert sind. Bioinformatische Analysen haben gezeigt, dass etwa 30 bis 50 % des menschlichen Genoms durch miRNAs reguliert sind (Lewis et al., 2005; Park und Kim, 2013; Xie et al., 2005). Weiterhin wurde geschätzt, dass 75 %

aller Regulationen auf Proteinlevel durch miRNAs beeinflusst werden (Huntzinger und Izaurralde, 2011).

MiRNAs stammen meist von Genen, die nicht für Proteine kodieren, oder von Introns proteinkodierender Gene (Kim et al., 2009). Primäre miRNA-Transkripte (pri-miRNAs) werden durch Endonukleasen (Drosha) zu pre-miRNAs geschnitten. Diese sind etwa 70 Nukleotide lang (Gregory et al., 2004) und werden von Exportin-5 aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert (Yi et al., 2003), wo eine weitere Endonuklease (Dicer) doppelsträngige miRNA-Moleküle generiert. Diese werden in den "miRNA-induced silencing complex" (miRISC) geladen, wo der aktive Strang der miRNA an die Ziel-mRNA bindet und deren Translation hemmt oder zu deren Abbau führt (Béthune et al., 2012; Filipowicz et al., 2008). Häufig liegen die Bindestellen der miRNAs in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der mRNA. Die Bindung erfolgt oft an imperfekt komplementäre Sequenzen. Dadurch kann eine einzige miRNA die Expression hunderter mRNAs regulieren. Umgekehrt kann eine mRNA durch zahlreiche miRNAs reguliert werden (Lim et al., 2005).

Im ZNS spielen miRNAs eine Rolle bei der Neurogenese, Axonensprossung und dem Überleben von Neuronen (Hébert und De Strooper, 2009; Kosik, 2006). Die experimentelle Herunterregulation von miRNAs in Purkinjezellen des Cerebellums von transgenen Mäusen durch „knock-out“ von Dicer führt zu progressiver Neurodegeneration und Ataxie, was einen Einfluss von miRNAs auf neurodegenerative Krankheiten nahelegt (Schaefer et al., 2007). Im Hippokampus von Mäusen führte die Inaktivierung von Dicer (*in vivo*) zur einer reduzierten Verzweigung von Dendriten und zu Veränderungen in der Dichte und Länge von dendritischen Dornfortsätzen (Davis et al., 2009).

Um Versuche zu Funktion und Wirkung individueller miRNAs durchführen und analysieren zu können, ist die Verwendung einer einheitlichen miRNA-Nomenklatur erforderlich. MiRNAs werden nach Entdeckung mit fortlaufenden Nummern benannt, sodass die Nummerierung keinen Rückschluss auf Funktion oder Genloci der miRNA zulässt. MiRNAs werden in Familien zusammengefasst, wenn sie auf demselben Gen liegen. Aus einer pre-miRNA können zwei unterschiedliche miRNAs generiert werden, wenn von beiden Seiten der Haarnadelstruktur der pre-miRNA eine miRNA entsteht. Ist bekannt, welche die dominante, also die funktionelle Version der miRNA ist, wird die nicht-dominante mit einem \* gekennzeichnet. Da inzwischen vermutet wird, dass oft beide Versionen funktionell sein können, werden die Varianten häufig mit -5p und -3p gekennzeichnet. Daher haben miRNAs mit derselben Nummer, die sich aber durch die 3p/5p Endung unterscheiden, nicht zwangsläufig ähnliche Sequenzen und Ziel-mRNAs.

MiRNAs mit ähnlichen Sequenzen werden mit Buchstaben direkt hinter der miRNA-Nummer gekennzeichnet (Beispiel: miRNA-30a und miRNA-30e). Sind die Sequenzen zweier miRNAs von unterschiedlichen Precursors identisch, werden diese mit einer zusätzlichen Nummerierung gekennzeichnet (Beispiel miRNA-121-1, miRNA-121-2). Zusätzlich wird vor die miRNA-Nummer ein Kürzel für die Spezies, in welcher die miRNA gefunden wurde, gestellt (z. B. „hsa“ für Homo sapiens und „rno“ für Rattus norvegicus; Ambros et al., 2003).

#### 2.4.2. Therapeutische Anwendung

Ein Ziel von miRNA-Studien ist, diese als Ziele für neue Therapeutika zu nutzen. So könnten z. B. miRNAs, die in einem pathologischen Zustand signifikant hochreguliert sind, bei Patienten therapeutisch unterdrückt werden und so eine Normalisierung des beeinflussten Signalweges hervorrufen. Es gibt bereits verschiedene Ansätze, wie diese *in vivo* Manipulation im Gehirn durchgeführt werden kann. Für diesen Zweck existieren verschieden modifizierte, künstliche Oligonukleotide, die eine komplementäre Sequenz zu der zu manipulierenden miRNA haben (Antagomire). Um zu verhindern, dass das zellfremde Oligonukleotid abgebaut wird, verwendet man modifizierte Nukleotide wie „locked nucleic acids“ (LNAs), die resistenter gegen Nukleasen sind als endogene Oligonukleotide. Eine weitere Möglichkeit zur Unterdrückung endogener miRNAs ist das Einschleusen von sogenannten miRNA-sponges (Ebert und Sharp, 2012; Hansen et al., 2013). Dabei handelt es sich um mRNA-Vektoren, die mehrere Bindungsstellen für die jeweilige miRNA enthalten. Eine Hochregulation von miRNAs *in vivo* erfolgt durch die Injektion sogenannter miRNA-Mimics (Agomire), die die gleiche Basensequenz wie die endogene miRNA haben. Die Durchführung einer solchen Hochregulation ist allerdings kompliziert, da die Mimics schnell abgebaut werden und so für einen anhaltenden Effekt kontinuierlich appliziert werden müssen (Henshall et al., 2016). Eine weitere Möglichkeit zur Hochregulation von miRNAs ist das Einschleusen von rekombinanten Adeno-assoziierten Viren, die nach Injektion zur Überexpression der miRNA führen (Christensen et al., 2010).

Bislang sind keine miRNA-basierten Therapeutika zugelassen, allerdings haben einige die präklinische oder klinische Testphase erreicht. Unter anderem hat ein Antagomir gegen miRNA-122 zur Behandlung von Hepatitis-C-Infektionen (Miravirsen) die Phase II (erstmalige Einnahme des Medikaments durch Patienten) erreicht (Nunnari und Schnell, 2011; Titze-de-Almeida et al., 2017).

### 2.4.3. MiRNAs und Epilepsie

Sowohl in Tiermodellen der Epilepsie als auch in Gewebe und Blut menschlicher Epilepsiepatienten (Raoof et al., 2017) fanden sich signifikante Veränderungen von Expressionsmustern verschiedener miRNAs gegenüber gesunden Kontrollen. Einige miRNAs zeigten eine konsistente Regulation in verschiedenen Modellen und wurden daher weitergehend untersucht. Funktionelle Analysen mittels *in vivo* Manipulationen in Tiermodellen haben bei einigen miRNAs einen kausalen Zusammenhang der Regulation und der Entstehung spontaner Anfälle gezeigt. Um eine stets aktuelle Übersicht der signifikant regulierten miRNAs in verschiedenen Epilepsiemodellen und bei verschiedenen Epilepsiesyndromen bei Patienten sowie funktionell analysierter miRNAs zu ermöglichen, wurde die Datenbank EpimirBase eingerichtet (Mooney et al., 2016). MiRNAs, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Epilepsien spielen, sind unter anderem: miRNA-124-3p, miRNA-129-5p, miRNA-132-3p, miRNA-134-5p und miRNA-146a-5p. MiRNA-124-3p war in verschiedenen Epilepsiemodellen im Hirngewebe herunterreguliert. Experimentelle Hochregulation mittels Mimics erwies sich als antiepileptogen und antikonvulsiv. Die Wirkung wird möglicherweise über NRFS (neuron restrictive silencing factor) vermittelt (Brennan et al., 2016). In zwei Epilepsiemodellen der Ratte (systemische Pilocarpin- oder PTZ-Injektion) sowie im Gewebe von Epilepsiepatienten wurde ebenfalls eine Herunterregulation dieser miRNA gemessen. Die miRNA-129-5p beeinflusst die neuronale Erregbarkeit über Regulation von spannungsabhängigen Kalium ( $Kv1.1-K^+$ ) -Kanälen (Sosanya et al., 2013). Eine Hochregulation der miRNA-129-5p wurde im KA- und im PPS Modell nachgewiesen. Weiterhin wurde eine neuroprotektive Wirkung dieser miRNA durch *in vivo* Manipulation im KA-Modell gezeigt und eine funktionelle Interaktion mit dem RNA-Bindeprotein RBfox1 wurde nachgewiesen (Rajman et al., 2017). MiRNA-132-3p wurde als relevant für die mTLE befunden, da sie in zahlreichen Modellen hochreguliert ist (systemisches Pilocarpin; Huang et al., 2015; Kretschmann et al., 2014; McKiernan et al., 2012; Risbud und Porter, 2013; Roncon et al., 2015; Song et al., 2011; Systemisches KA; Schouten et al., 2015; Hippokampus-Stimulation; Gorter et al., 2014, Amygdala-Stimulation, Bot et al., 2013). Außerdem wurde in resezierten Hippokampi von Kindern mit mTLE eine Hochregulation gemessen (Peng et al., 2013). Die funktionelle Inhibition mit LNAs hat eine neuroprotektive Wirkung in einem Epilepsiemodell der Maus (intra-amygdaläres-KA-Modell; Jimenez-Mateos et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass miRNA-134-5p eine Rolle in der Entwicklung synaptischer Dornfortsätze spielt. Die Überexpression der miRNA-134-5p in hippocampaler Neuronenkultur induzierte eine Verminderung des Volumens synaptischer Dornfortsätze (Schratt et al., 2006). *In vitro* wurde gezeigt, dass lentivirale Inhibition dieser miRNA Anfallsaktivitäten, ausgelöst durch verminderte  $Mg^{2+}$ -

Konzentration, in Hirnschnitten unterdrückt und somit neuroprotektiv wirkt (Wang et al., 2014). MiRNA-134-5p wird von SIRT1 (Sirtuin 1) über einen Repressorkomplex mit dem Transkriptionsfaktor YY1 reguliert. Die miRNA inhibiert die Translation von BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) und CREB (cAMP response element-binding protein). Die Abwesenheit von SIRT1 führt zu verstärkter miRNA-134-5p-Expression und Herunterregulation von BDNF und CREB, was eine Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität gemessen an reduzierter LTP und Gedächtnisbildung zur Folge hat (Gao et al., 2010). Weiterhin wurde gezeigt, dass miRNA-134-5p die Translation von Pumilio2-mRNA hemmt und so die Axonensprossung unterstützt (Fiore et al., 2009). Eine Herunterregulation der miRNA-134-5p *in vivo* führe zu antikonvulsiven Effekt bei Ratten in verschiedenen Epilepsiemodellen (KA-Modell (Jimenez-Mateos et al., 2012), 30-30-8-PPS Modell, Pilocarpin-Modell und PTZ-Modell (Reschke et al., 2017)). MiRNA-146a-5p war eine der ersten miRNAs, die im Zusammenhang mit mTLE identifiziert wurde, da eine Hochregulation in Astrozyten epileptischer Ratten sowie im Gehirn von mTLE-Patienten gemessen wurde (Aronica et al., 2010). Später wurde eine Interaktion über den Interleukin(IL)-1 $\beta$ -Signalweg nachgewiesen (Iyer et al., 2012), welcher als pro-exzitatorisch gilt. Außerdem wurde eine Reduktion spontaner Anfälle durch Hochregulation dieser miRNA vor Auslösen eines SE im intraamygdalar-KA-Modell nachgewiesen (Iori et al., 2017).

Zusammenfassend wurden miRNAs bisher vorrangig über Prozesse der Neurogenese, Apoptose, synaptischen Struktur und Funktion und Entzündungsreaktionen in Verbindung mit der mTLE gebracht (Brennan und Henshall, 2016). Diese bisherigen Erkenntnisse verdeutlichen, dass die pleiotrope Wirkung von miRNAs ein Vorteil für die Entwicklung miRNA-basierter Medikamente sein kann, da ein kompletter Signalweg durch die Regulation einer einzelnen miRNA moduliert werden kann. Allerdings kann diese Eigenschaft auch von Nachteil sein, da durch das Wirken auf mehrere mRNAs unerwartete Nebenwirkungen bei veränderter Expression einer miRNA auftreten können und Wirkmechanismen schwer vorherzusagen und teilweise kontextabhängig sind (Henshall et al., 2016). Eine besondere Herausforderung in der miRNA-Forschung stellt die zelltypspezifische Funktion und Expression von miRNAs dar (Sood et al., 2006).

#### 2.4.4. MiRNAs und DBS

DBS kann die Expression von miRNAs beeinflussen. So wurde gezeigt, dass die Regulation 5 verschiedener miRNAs, die bei der Entwicklung von M. Parkinson auftritt, durch DBS des Nucleus subthalamicus umgekehrt werden kann (Soreq et al., 2013). Nach Stimulation der Nuclei fastigii bei zerebraler Ischämie wurde eine Regulation mehrerer miRNAs im Kortex von Ratten gemessen (Feng et al., 2015).

Aufgrund der beschriebenen Beteiligung von miRNAs an zahlreichen metabolischen, neurodegenerativen und –regenerativen, exzitatorischen und inhibitorischen Prozessen sowie ihrer pleiotropen Wirkung stellen miRNAs interessante Kandidaten für die Vermittlung der antikonvulsiven Wirkung der DBS dar.

## 2.5. Ziele und Hypothesen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass die Wirkung der DBS auf Epileptogenese bzw. manifeste Epilepsie im Tiermodell der mTLE-HS durch eine DBS-induzierte Beeinflussung der hippocampalen miRNA-Expression vermittelt wird. Hierzu wurden folgende Ziele verfolgt:

- 1) Etablierung eines DBS-Paradigmas, das die Epileptogenese und/oder die klinischen Parameter einer manifesten mTLE-HS im Tiermodell signifikant beeinflusst.
- 2) Vergleich der hippocampalen miRNA-Expression zwischen Tieren, die mit einem wirksamen DBS-Paradigma behandelt wurden, und epileptischen Kontrolltieren.



### 3. Material und Methoden

#### 3.4. Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (350-450 g) von Charles River verwendet. Es wurden 162 Ratten operiert. Die Zahl ergibt sich aus Abbildung 8.

#### 3.5. Material

- Ableitelektroden (20 mm Länge, 0,25 mm Durchmesser; E363-1-SPC Elec, PlasticsOne, Roanake, VA, USA)
- alkoholischen Desinfizienz (Kodan, Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland)
- Antennen (Loop Antenna, A3015C, Open Source Instruments, Inc., Watertown, MA, USA)
- BNC-Kabel (div. Hersteller, z. B. Sygonix GmbH, Nürnberg, Deutschland)
- Bohrer (Model 1471 Stereotaxic Drill, David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA)
- Buprenorphin (Temgesic, Reckitt Benckiser, Heidelberg, Deutschland)
- Dexpanthenol-Salbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland)
- Dummy (C317DC-SPC, PlasticsOne, Roanake, VA, USA)
- Erd- und Befestigungsschrauben (3,2 mm Länge, 1 mm Gewindedurchmesser, Screw 0-80X1-8 1212 080 X.125, PlasticsOne, Roanake, VA, USA)
- Futter (LASQC diet Rod16 bestrahlt, LAS-vendi, Soest/Westfalen, Deutschland)
- Injektionskanülen (C317G-SPC Guide 23GA, PlasticsOne, Roanake, VA, USA)

- Isofluran (Forene, AbbVie, Wiesbaden, Deutschland)
- Käfigstreu (z. B. Weichholzgranulat, ZO-ONLAB GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland)
- Kabel: bipolar, 363A-2-340-2, PlasticsOne, Roanake, VA, USA Kommutator (SL6C, PlasticsOne, Roanake, VA, USA)
- Kugelkopf-Fräser (Proxxon, Föhren, Deutschland), Durchmesser 1 mm
- Kunststoffboxen („Typ 4“, 55 x 33 x 20 cm, Ehret, Deutschland) mit Gitterdeckeln („Typ 4 Standard“, 55,7 x 33,2 x 0,5 cm, Ehret, Deutschland)
- Typ-3-Käfige (Kunststoff, hauseigene Anfertigung)
- Löt看wasser (z. B. Löt看wasser, 24220051, Felder GmbH Löttechnik, Oberhausen, Deutschland)
- Löt看zinn (z. B. Löt看zinn bleifrei SN99Cu1, Stannol, Wuppertal, Deutschland)
- Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific Fisher, Darmstadt, Deutschland)
- *mirVana*<sup>TM</sup> miRNA Isolation Kit (Thermo Scientific Fisher, Darmstadt, Deutschland)
- Nahtmaterial: resorbierbar: PGA Resorba, 4/0, DS 18 (Karl Hammacher, Solingen, Deutschland)
- Nahtmaterial: nichtresorbierbar: Silkam, 3/0, DS 19 (Braun Aesculap, Rubi, Spanien)
- Primer für PCR: MAPK8, AZIN, GRB2, KRAS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Schraubsockel (MS363 Pedestal 2298 6 Pin, PlasticsOne, Roanake, VA, USA)
- Silberdraht (AG-5W, Science Products, Hofheim, Deutschland)
- Skintunneler (Skin Tunneling Needle 4,8 x 3,2 mm, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)
- Steckkabel (363A-2-343-2, PlasticsOne, Roanake, VA, USA)
- Stecksockel (E363-0 Socket Contact Skewed, PlasticsOne, Roanake, VA, USA)

- Transmitter (A3028R-okFB, Open Source Instruments, Inc., Watertown, MA, USA)
- stereotaktische Arme (David Kopf Instruments)
- stereotaktischen Rahmen (David Kopf Instruments)
- Stimulationselektroden: Edelstahlelektroden (25 mm Länge, 0,125 mm Durchmesser, Isolierungs-schichtdicke 0.005 mm; E363-3-SPC, PlasticsOne, Roanoke, VA, USA)
- Transmitter (A3028R-FB, Open Source Instruments, Inc., Watertown, MA, USA)
- Verso-cDNA-synthese Kit (Thermo scientific Fisher, Darmstadt, Deutschland)
- Wärmematte (ThermoLux Wärmeunterlage 463265, Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland)
- Wasser (pH 3,0 bis 3,5)
- Wattestäbchen (Dirk Rossmann GmbH, Burgwedel, Deutschland)
- Zahnzement (Paladur, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland)
- Zellstoff (Sugi Sponge Points, Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenbach, Deutschland)

### 3.6. Geräte/Software

- A/D-Wandler (AD Instruments, Oxford, UK)
- Aufzeichnungsrechner (iMac, Apple)
- Cytoscape
- Datenempfänger (Octal Data Receiver, A3027, Open Source Instruments, Watertown, MA, USA)
- Differenz-Verstärker (Model 440 Instrumentation Amplifier, Brownlee Precision/Neurophase, Santa Clara, CA, USA)
- Geneamp PCR System 2400 (Thermo scientific Fisher, Darmstadt, Deutschland)

- Netzwerkinterface (LWDAQ Driver with Ethernet Inter-face, A2071E, Open Source Instruments, Watertown, MA, USA)
- PowerLab/4SP, (AD Instruments, Oxford, UK)
- Stimulusgenerator (Grass S88, Grass Telefactor/Grass Instruments, West Warwick, RI, USA)
- Stimulusisolator (Model SIU5, Grass Instruments, West Warwick, RI, USA)
- Stimulusisolator und Verstärker (Modell P55C, Grass Instruments, West Warwick, RI, USA)
- Software Scope (AD Instruments, Oxford, UK)
- Verdampfer (Rockmart GA, USA)

### 3.4. Methoden

#### 3.4.1. Elektroden- und Transmitterimplantation

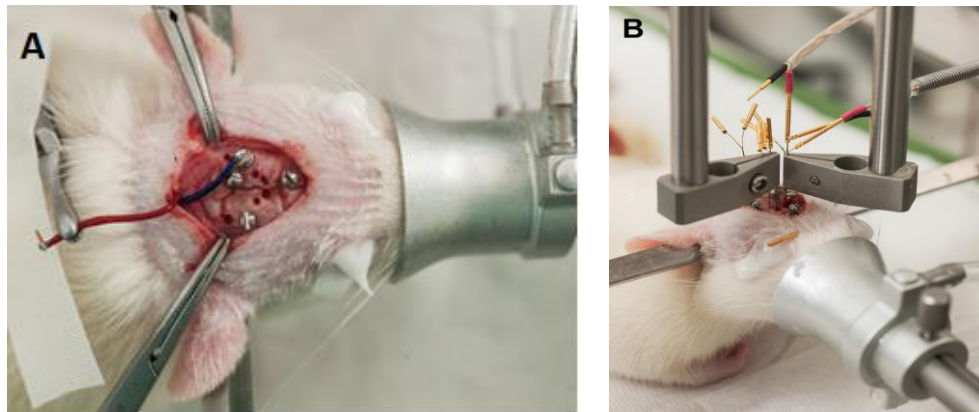
Für die Implantation der Elektroden wurden die Ratten zunächst gewogen und dann mittels Isofluran-Inhalationsnarkose anästhesiert. Als Analgetikum wurde Buprenorphin subkutan verabreicht (0,167mg/kg). Die Narkoseeinleitung wurde mit 5 % Isofluran durchgeführt. Die Narkose während der Operation wurde mit 2 bis 3 % Isofluran aufrechterhalten. Als erstes wurde die Ratte an der linken Flanke und auf dem Kopf rasiert. Um zu verhindern, dass die Ratte während der Operation auskühlt, wurde sie auf einem Wärmekissen platziert. Nach Erreichen eines schmerzfreien Zustandes, was anhand des Zwischenzehtests überprüft wurde, wurde die Ratte in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt. Dafür wurden die Schneidezähne in einem Zahnbügel eingehängt und der Kopf wurde durch Einbringen zweier Ohrenstifte in den Gehörgang am Schädel fixiert und mittig ausgerichtet. Anschließend wurde die Schädelkalotte freigelegt, indem zunächst die Kopfhaut leicht angehoben wurde und mit einer Schere ein ovales Stück der Kopfhaut entfernt wurde. Dann wurde das freiliegende Periost entfernt und die Ränder wurden mit 4 Halsted-Klemmen fixiert, sodass Bregma und Lambda gut sichtbar waren. Mit einem Bohrer mit Diamant-besetztem Kugelkopf-Fräser mit 1 mm Durchmesser, eingespannt in einen stereotaktischen Arm, wurden unter Schonung der Dura die für die Elektroden und 4 Haltschrauben vorgesehenen Löcher in die Schädelkalotte gebohrt. Zwei Löcher für Haltschrauben wurden je leicht lateral zwischen Ableit- und Stimulationselektrode gesetzt, eine weitere wurde rostral der rostralen Koronarnaht links der Mittellaht und eine weitere Schraube links der Mittellaht,

rostral zu Lambda vorgesehen. Die Koordinaten für die Elektroden sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Löcher für die Stimulationselektroden wurden von Hand auf die etwa 1,5-fache Breite vergrößert. War das Versuchstier für eine DBS der FF oder VHC vorgesehen, wurden zwei zusätzliche Löcher an den dafür vorgesehenen Koordinaten gebohrt. Für die DG-Stimulation wurden anstelle der Ableitelektroden Stimulationselektroden implantiert. Die Ableitung erfolgte in diesem Fall von einer 2,2 mm weiter kaudal gelegenen Lokalisation des DG.

**Tabelle 3:** Koordinaten der Elektrodenpositionen für die PPS, Ableitung aus dem DG und DBS der Stimulationsziele.

AP: anterior-posterior; MA: medial-lateral; DV: dorsal-ventral

Stimulationsziel	AP	ML	DV
		[mm zur Mittellinie]	[mm von Hirnoberfläche]
DG (Ableitung/Stimulation)	-3 mm von Bregma	+/- 2	~4,5
DG (Ableitung)	-5,2 mm	+/- 3	~4,5
PP (Stimulation)	unmittelbar rostral von Lambda	+/-4,5	~3,5
FF (Stimulation)	-1,6 mm von Bregma	+/-0,8	~4,9
VHC (Stimulation)	-1,5 mm von Bregma	+0,15	~4,2



**Abbildung 1** Ratte während der Elektrodenimplantation

**A** Aufsicht auf den Rattenschädel während der Operation. Bohrlöcher für die Implantation von FF-Stimulationselektroden (rostral), DG-Ableitelektroden (dahinter) und PP-Stimulationselektroden (kaudal) sind vorbereitet. Vier Halteschrauben wurden eingedreht, eine davon ist mit dem blauen Erdungskabel des Transmitters verbunden. Bei dem roten Kabel handelt es sich um das Ableitkabel des Transmitters, welches später mit einer der Ableitelektroden verbunden wird. **B** Seitenansicht der Ratte während der Implantation der FF-Stimulationselektroden. Die Ableitelektroden sowie PP-Stimulationselektroden sind bereits implantiert. Während der Implantation erfolgt eine Ableitung evozierter Potentiale vom DG.

Anschließend wurde für die Transmitter-Implantation mit einem Skalpell ein Hautschnitt von etwa 5 cm Länge etwa 2 cm links der Wirbelsäule gesetzt und mit einer stumpfen Klemme wurde eine Hauttasche zwischen Brustkorb und Oberschenkel präpariert, sodass für den Transmitter ausreichend Platz in ventrale Richtung und zusätzlich Platz für die Transmitterantenne in dorsale Richtung vorhanden war. Dann wurde der Transmitter in die Tasche gelegt, und mit einem Skintunnler wurde ein Kanal ausgehend von der Hautöffnung am Kopf, links der Wirbelsäule bis zum Hautschnitt in der Flanke bereit. Das Erdungs- und Ableitkabel des Transmitters wurde in den Skintunnler geschoben und dieser wurde zurück Richtung der Hautöffnung am Kopf gezogen, sodass die Kabel durch den Kanal vom Transmitter bis zum Kopf unter der Haut verlegt waren, wo sie zunächst mit einer Bulldogklemme fixiert wurden. Anschließend wurde die Tasche an der Flanke zunächst mit resorbierbarem Faden subkutan und dann mit nicht-resorbierbarem Faden die Kutis vernäht. Dann wurde die Erdschraube des Transmitters in das Loch links zwischen Stimulations- und Ableitelektrode gedreht, sodass sich der Schraubkopf noch zu etwa 0,5 – 1 mm über der Schädelkalotte befand. Anschließend wurden drei weiteren Halteschrauben ebenso in die Kalotte gedreht. Um die vordere Halteschraube wurde ein Silberdraht mit angelötetem Pin gedreht, der als Erde für die kabelgebundene Ableitung während der Stimulation diente. Das freie Ende des Silberdrahts wurde rostral unter die Haut geschoben.

Um die Stimulationselektroden im PP zu platzieren, wurden diese zunächst in die stereotaktischen Arme eingespannt und senkrecht über den Bohrlöchern platziert. Ein Stimulusgenerator wurde über einen Stimulusisolator mit den Stimulationselektroden verbunden und die Ableitelektrode wurde über ein Stechkabel mit einem Differenz-Verstärker verbunden. Der linke Ohrbalken wurde mit einer Krokodilklemme mit dem Verstärker verbunden, was als Erdung diente. Die Eingangssignale wurden 10-fach verstärkt. Die Darstellung der Impulse erfolgte nach Analog-Digital-Umwandlung durch die Software Scope an einem Computer.

Die Ableitelektroden wurden auf Höhe der dafür vorgesehenen Bohrlöcher über dem DG platziert. Alle 4 Elektroden wurden zunächst 2 mm abgesenkt. Anschließen wurden die Elektroden anhand der evozierten Potentiale, wie unter Punkt 3.4.2. beschrieben, ausgerichtet. Da meist im Laufe der Adjustierung der Elektroden ein vorübergehender refraktärer Zustand erreicht wurde, in dem keine Reizweiterleitung mehr gemessen werden konnte, wurde die Stimulation an diesem Zeitpunkt für etwa 3 Minuten unterbrochen, um anschließend wieder evozierte Potentiale ableiten zu können. Anschließend wurden die Elektroden mit Zahnzement am Schädel befestigt. Im Falle weiterer zu implantierender Elektroden im Bereich der FF oder der VHC wurde der

Schädel vorsichtig von kaudal bis zu den Ableitelektroden mit Zahnzement bedeckt, sodass der rostrale Bereich frei blieb. Als nächstes wurden die Elektroden für die DBS senkrecht über die dafür vorgesehen Löchern platziert und soweit abgesenkt, wie in Tabelle 3 als DV angegeben. Dort wurden 5 Doppelpulse mit 10 V und 0,5 Hz auf die Stimulationselektrode geleitet. Die evozierten Potentiale wurden am DG abgeleitet. Konnte kein evoziertes Potential abgeleitet werden, wurde die Elektrode erneut ausgerichtet und die Aufzeichnung des Potentials wiederholt. Anschließend wurden die Elektroden mit Zahnzement befestigt und so gebogen, dass sie möglichst wenig Platz einnahmen. Die Elektroden-Pins wurden in ein Pedestal gesteckt, und die Positionen für die einzelnen Elektroden wurden für die späteren Stimulationen notiert. Im Falle einer später geplanten FF/DG/VHC-DBS wurden 2 Pedestals verwendet. In das rostrale Pedestal wurden die PP-Stimulationselektroden sowie die DG-Ableitelektroden und die Erdung gesteckt, in das kaudale Pedestal wurden die Stimulationselektroden für die DBS gesteckt. Dann wurden die Pedestals mittels Zahnzement so befestigt, dass alle Elektroden bedeckt waren.

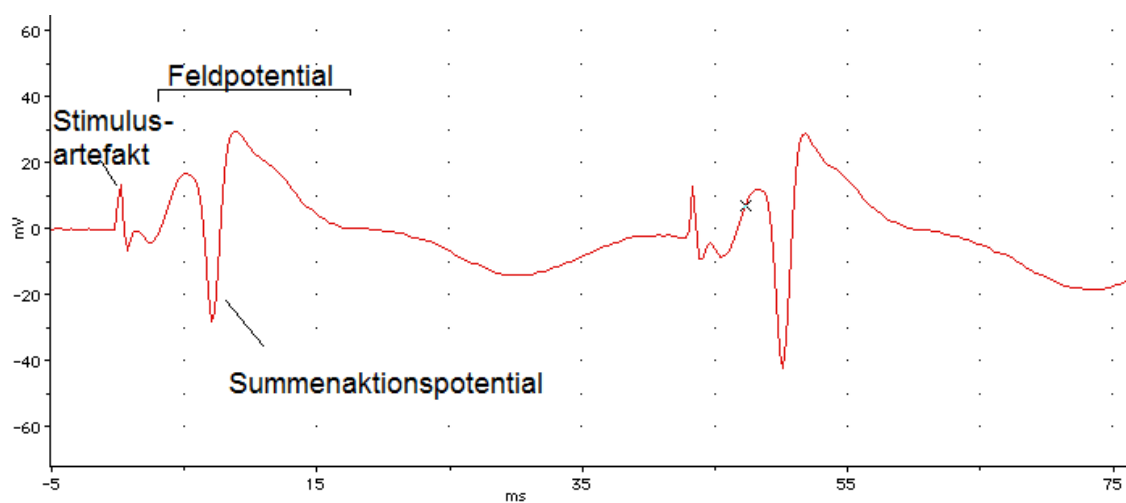
#### 3.4.2. Evozierte Potentiale

Zur Evaluierung der Elektodenposition im Gehirn wurden während der Implantation evozierte Potentiale (EP) im DG abgeleitet. Für die Implantation der Stimulationselektroden in den PP wurden Stimulations- und Ableitelektroden zunächst 2 mm abgesenkt. Dabei wurde mit einer Frequenz von 0,5 Hz und einer Spannung von 20 V stimuliert. Anschließend wurden die Stimulations- und Ableitelektroden sukzessive in ventrale Richtung abgesenkt und die Morphologie der EP visuell beurteilt.

Die PPS führt zur Ausbildung von EPSP in den distalen Dendriten der Körnerzellen. Da hierbei Kationen nach intrazellulär gelangen, entsteht ein negatives extrazelluläres Feldpotential. Die Kationen treten im Bereich des Somas und des Axons wieder aus der Körnerzelle aus. Bei Absenkung der Ableitelektrode findet man daher eine Phasenumkehr des Feldpotentials. Die Elektrode wurde in einer Tiefe fixiert, bei der das Feldpotential maximal positiv war (meist ca. 4,0- 4,5 mm).

Bei korrekter Platzierung der Stimulationselektrode werden die Fasern des PP so stark depolarisiert, dass die EPSP in den Körnerzellen des DG überschwellig werden und zahlreiche Körnerzellen fast gleichzeitig Aktionspotentiale (AP) generieren. Deren extrazelluläres Feldpotential ist im Bereich der Somata der Körnerzellen negativ, da dort Kationen nach intrazellulär fließen. Das Feldpotential des Summenaktionspotentials (SAP) tritt naturgemäß erst kurz nach dem Feldpotential der EPSP auf, die die Summation der EPSP Voraussetzung für die Entstehung der AP ist. Andererseits ist das

Feldpotential der SAP von kürzerer Dauer als das Feldpotentials der EPSP. Daher überlagern sich die Potentiale in charakteristischer Form (Abb. 2). Die Ableitung dieser EP-Morphologie ermöglichte es, bereits intraoperativ Sicherheit über die korrekten Elektrodenlagen (PP, Körnerzell-Somata des DG) zu gewinnen. Hierdurch konnte vermieden werden, Tiere nach monatelangem Video-EEG-Monitoring nachträglich wegen fehlerhafter Elektrodenpositionen auszuschließen. Ratten, bei denen das Feldpotential des SAP nicht mindestens eine Amplitude von 2 mV erreichte, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Dieser empirische Wert wurde der Literatur entnommen (Matzen, 2006).



*Abbildung 2 Beispiel für ein evoziertes Potential abgeleitet aus der Körnerschicht des DG während Stimulation des PP mit 20 V (Doppelpulse mit 40 ms Pulsabstand und Pulsdauer von 0,1 ms). Das Signal wurde für die Darstellung 10fach verstärkt.*

Evozierte Potentiale durch Stimulation der FF und VHC wurden zunächst in Vorversuchen evaluiert. Hierfür wurden die Elektroden nach Koordinaten aus dem stereotaktischen Atlas des Rattenhirns (Paxinos & Watson, 1998) platziert. Dann wurde ein gemitteltes Signal über 5 Doppelpulse mit 0,5 Hz und 10 V aufgenommen. Nach Befestigung der Elektroden wurde die Position der Elektrodenspitzen markiert, indem 5-mal eine Spannung von 50 V mit „direct current“ angelegt wurde. Die Ratte wurde anschließend, wie unter 3.4.6 beschrieben, mit PFA perfundiert. Durch Anfertigen von 100 µm dicken Schnitten am Kryotom konnte durch optische Kontrolle die Elektrodenposition überprüft werden. Die Koordinaten wurden optimiert, bis die Elektrode die angestrebte Position hatte, und dann für die weiteren Operationen



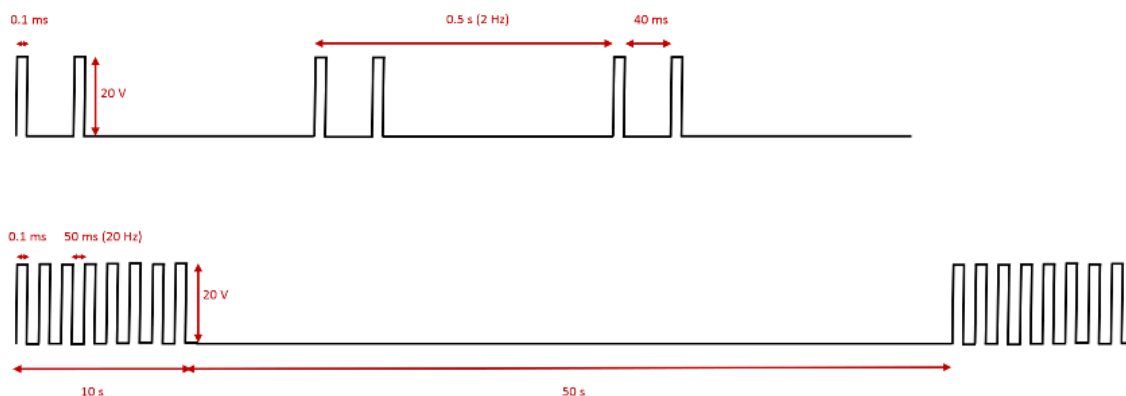
verwendet. Die EP, welche bei der Stimulation während dieser Operation abgeleitet wurde, diente als Referenz für die weiteren Implantationen.

### 3.4.3. Kontinuierliches Video-EEG Monitoring

Mittels eines Differenzverstärkers, der das Signal der Ableitelektrode von dem der Erdung subtrahiert, können kleine Änderungen der extrazellulären Feldpotentiale gemessen werden. Diese Änderungen wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Zusätzlich wurde ein Teil der Ratten durchgehend gefilmt. Die Videos wurden zur Analyse herangezogen, wenn das EEG-Signal keine eindeutige Anfallserkennung zuließ, beispielsweise zur Unterscheidung zwischen Anfällen und Putzartefakten. Die Analyse der EEG-Signale ist unter 3.4.7 beschrieben.

### 3.4.4. Tractus Perforans Stimulation

Nach einer 7-tägigen Erholungsphase im Anschluss an die Operation wurde der PP der Ratten an zwei aufeinanderfolgenden Tagen für je 30 min elektrisch stimuliert. Am dritten Tag wurde eine 8 h-PPS durchgeführt. Dafür wurden die Ratten über einen drehbaren Kommutator mit dem Stimulator verbunden, sodass sich die Ratte während der Stimulation frei bewegen konnte. Die Stimulation erfolgte im Käfig der Ratte. Eine kontinuierliche Stimulation wurde mit 20 V starken Doppelpulsen mit einer Frequenz von 2 Hz appliziert. Zusätzlich wurde pro Minute ein 10 s „Train“ mit Einzelpulsen von 20 V und einer Frequenz von 20 Hz appliziert. Das Stimulationsparadigma ist in (Norwood et al., 2010) beschrieben.



*Abbildung 3 Stimulationsparadigma der PPS mit kontinuierlichen 2 Hz Doppelpulsen von 20 V und zusätzlichen 10-sekündigen 20 Hz Einzelpuls-Trains (grafische Darstellung nicht maßstabsgerecht).*

### 3.4.5. Langzeitstimulation (DBS)

Für die Langzeit-Stimulation wurden die Ratten, wie auch für die PPS, über einen drehbaren Kommutator mit einem Stimulationskabel an den Stimulator angeschlossen. Anschließend wurde für eine beziehungsweise zwei Wochen eine Stimulation mit den folgenden Parametern durchgeführt:

HF: 130 Hz, 0,1 V; Einzelpulse, 0,1 ms

LF: 5 Hz und 2 V oder 1 Hz und 1 V; Einzelpulse, 0,1 ms

Die Stimulationsparadigmen wurden durch Vergleiche verschiedener verwendeter Paradigmen in der aktuellen Literatur erarbeitet, welche in der Einleitung unter Absatz 2.1.7 beschrieben sind. Da in klinischen Studien oft ein konstanter Strom anstelle einer konstanten Spannung verwendet wird, wurden die angegebenen Stromstärken mittels des Ohmschen Gesetzes unter Annahme eines spezifischen Widerstandes des Hirngewebes von 5  $\Omega$ m (Klimovskaia et al., 1985) auf die anzulegende Spannung umgerechnet. In der Literatur finden sich als LFS-Paradigmen häufig Angaben von 5 Hz und 200-500  $\mu$ A. Für die HFS wird meist eine Frequenz von 130 Hz mit einer Stromstärke von 100-500  $\mu$ A verwendet (z. B. Kile et al., 2010; Van Nieuwenhuyse et al., 2015; Wyckhuys et al., 2010). 200  $\mu$ A entsprechen bei einem Elektrodenabstand von 1 mm und einem Widerstand von 5  $\Omega$ m einer Spannung von 1 V, 500  $\mu$ A entsprechen 2,5 V.

Das Stimulationsparadigma für die VHC-DBS ist abweichend von denen für die anderen Ziele, da diese Methode eine direkte Replikation aus der Studie von Rashid et al. (2012) darstellt. In dieser und einer weiteren Publikation mit einem ähnlichen Stimulationsparadigma (Kile et al., 2010) wurde eine verminderte Anfallsfrequenz durch 14-tägige VHC-DBS in zwei Epilepsie-Modellen nachgewiesen.



*Abbildung 4 Ratte während der DBS über ein bissfestes Kabel, welches über einen drehbaren Kommutator im Käfigdeckel mit dem Stimulator verbunden ist. Die Ratte kann sich während der Langezeitstimulation frei in ihrem Käfig bewegen.*

#### 3.4.6. Transaortale Perfusion

Für die transaortale Perfusion wurde den Ratten zusätzlich zu einer Isoflurannarkose intraperitoneal Xylazin (15 mg/kg Körpergewicht; Narkose) und Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht; Analgesie) injiziert. Dann wurde der Brustkorb geöffnet. Die Perfusionsnadel wurde durch den linken Ventrikel in die Aorta eingeführt und mit einer Klemme fixiert. Dann wurde das rechte Atrium geöffnet, wodurch das Blut und die Perfusionslösung austreten konnten.

Für eine spätere miRNA-Sequenzierung wurden die Ratten für etwa 5 min mit 0,9 %iger eiskalter NaCl-Lösung perfundiert, bis die austretende Flüssigkeit weitestgehend klar was. Das Gehirn wurde entnommen, und die Hippokampi wurden bei -80 °C gelagert. Für die histopathologische Begutachtung wurde bei anderen Tieren nach etwa 3 min NaCl-Perfusion eine Perfusionsfixation mit 4%igem PFA (Paraformaldehyd) in PBS für 7 min durchgeführt. Anschließend wurde das Gehirn entnommen und in PFA/PBS bei 4 °C aufbewahrt.

### 3.4.7. EEG-Analyse

Das EEG-Signal wurde kontinuierlich aufgezeichnet und täglich auf Anfallsmuster, sowie andere epileptogene Signale wie Sharp waves und Spikes untersucht. Sharp waves sind Depolarisationen mit einer Dauer von 80-200 ms. Als Spikes bezeichnet man Depolarisationen mit einer Dauer von 40 bis 80 ms. Als Anfall wurden rhythmische, hochfrequente EEG-Muster mit einer Evolution in Amplitude, Frequenz und/oder Morphologie gewertet, die eine Dauer von 10 Sekunden nicht unterschreiten. Anzahl und Zeitpunkt der Anfälle wurde notiert und im Zweifelsfall von einem zweiten Begutachter sowie durch Analyse der Videoaufnahmen verifiziert.

### 3.4.8. MikroRNA „high-throughput-sequencing“

Die miRNA-Sequenzierung erfolgte im Rahmen des EpimiRNA-Verbundprojektes durch Mitarbeiter des iNANO-Institutes, Universität Aarhus, Dänemark. Der jeweils rechte Hippokampus wurde auf Trockeneis zur Analyse an das iNANO-Zentrum gesendet.

Dort wurde die High-throughput-Sequenzierung durchgeführt. Dafür wurde der gefrorene Hippokampus zunächst mit 200 µl Immunoprecipitation Puffer (300mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% NP-40, 50mM Tris-HCl pH7.5, enthält außerdem RNase- und Protease-Inhibitoren) homogenisiert. Durch Zentrifugieren (16.000 g, 15 min 4°C) wurde das Proteinlysate vorgereinigt (Entfernen von Zellkern und Membran). Dann wurde mittels Bradford-Assay die Proteinkonzentration bestimmt und 400 µg wurden mittels Magnetbeads gereinigt. Dazu wurde das Lysat 1 h bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurden die Beads durch Zentrifugation (13.000 g, 5 min, 4°C) und Abnahme des Überstandes entfernt. Dann wurde eine Argonaute2-Immunfällung (Ago2-IP) mit spezifischen Ago2-Antikörpern durchgeführt. Die Antikörper, welche an Magnetbeads gebunden sind, wurden zu dem Lysat gegeben und 12 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat gereinigt und die Magnetbeads mit den gebundenen Ago2-RNA Fragmente wurden in die RNA-Isolation eingesetzt. Dazu wurden die Beads in 200 µl Trizol gelöst. 100 µl Chloroform wurde zugegeben, 3 min inkubiert und dann zentrifugiert (13.000 rpm, 15 min, 4°C). Die obere, klare Phase wurde abgenommen und mit 225 µl Isopropanol und 1 µl Glycogen über Nacht inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (13.000 rpm, 15 min) wurde der Überstand verworfen, das Pellet wurde mit 400 µl Ethanol gewaschen und dann in 12 µl Wasser gelöst.

Diese Methode ermöglicht es, RNA zu isolieren, die an das Ago2 Protein, welches Bestandteil des miRISC ist, gebunden sind. Dadurch werden nur inhibitions-kompetente miRNAs isoliert.

5 µl der extrahierten RNA wurden zur Herstellung der RNA-Bibliothek eingesetzt. Dafür wurde das „Small RNA Sample Preparation Kit“ (Illumina) verwendet. Dabei werden zunächst 3'Adapter für die spätere Reverse-Transkriptions Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) an die RNA Stränge angehängt. Im nächsten Schritt werden Adapter an das 5' Ende der RNA ligiert. Anschließend wird die RT-PCR durchgeführt und die entstandene cDNA wird mittels Gelelektrophorese gereinigt. Größe und Reinheit der cDNA-Bibliothek wurde mit dem „2100 Bioanalyzer High sensitivity DNA Chip“ überprüft. Die cDNA-Konzentration wurde mit dem „KAPA Library Quantification Kit“ überprüft.

Die cDNA-Bibliotheken wurden dann an die Firma Exicon (München) gesendet und dort mittels „High-throughput-sequencing“ mit der „Illumina“ Technologie gemessen. Diese basiert auf der „Sequencing by synthesis“ Methode, die jedes Nukleotid bei Angliederung an das Template an einem abgesonderten spezifischen Fluoreszenz-Signal erkennt und so feststellt, wie häufig eine bestimmte Sequenz in der Probe vorhanden ist. Eine ausführliche Beschreibung der Technologie ist unter [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina\\_sequencing\\_introduction.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf) zu finden.

#### 3.4.9. RNA-Isolation

Zur Analyse der Regulation potentieller Ziel-mRNAs der miRNA-433-3p wurde zunächst RNA aus den linken Hippokampi der 6 Ratten isoliert, deren rechte Hippokampi für die Sequenzierung der späten Zeitpunkte (97 Tage nach PPS) genutzt wurden. Die RNA Isolation wurde mit dem *mirVana*<sup>TM</sup> miRNA Isolation Kit durchgeführt. Zunächst wurde das Gewebe mit einem Homogenisator in Lysis/Binding Buffer lysiert. Dann wurde 1/10 des Volumens an miRNA Homogenate Additiv dazu gegeben und das Lysat wurde für 10 min homogenisiert. Dann wurde eine Phenol/Chloroform Mischung dazu gegeben und die Proben wurden für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, wodurch drei Phasen entstanden. Bei der unteren Phase handelt es sich um eine organische Chloroformphase, die die Proteine enthält. Die Interphase enthält die DNA und die obere, wässrige Phase enthält die RNA. Diese wurde abpipettiert und die RNA wurde mittels Ethanol (EtOH, 100 %) gefällt und mittels Zentrifugation an einen Glassfiberfilter gebunden. Anschließend wurde die RNA mit verschiedenen Waschpuffern gereinigt und dann in Elution-Solution gelöst.

Die RNA-Konzentration wurde am NanoDrop bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm. Da Proteine eine maximale Absorption bei 280 nm haben, kann der Grad der Reinheit anhand des

260/280 nm Verhältnisses bestimmt werden. Ein Wert zwischen 1,8 und 2,1 indiziert reine RNA.

#### 3.4.10. Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription der RNA wurde das verso-cDNA-Synthesis Kit verwendet.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5x Synthesis Buffer	4 µl
Deoxyribonucleotidetriphosphate (dNTPs)	2 µl (5mM; dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Random Hexamers	0.7 µl (400 ng/µl)
Anchored OligodT	1.2 µl (500 ng/µl)
RT Enhancer	1 µl
Verso™ Enzyme Mix	1 µl
RNA-Template	800 ng
Water	ad 20 µl

Reaktionsablauf:

Phase	Dauer	Temperatur
cDNA-Synthese	30 min	42 °C
RT-Enhancer Inaktivierung	2 min	95 °C

#### 3.4.11. Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR (qPCR) wurde mit dem SYBR Green Master Mix durchgeführt. SYBR Green ist ein Farbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagert und dabei fluoresziert. Die Fluoreszenz kann gemessen werden und als Maß für die Menge an Transkript genutzt werden. Neben dem Farbstoff enthält der SYBR Green Master Mix eine DNA-Polymerase, Desoxynukleosidtriphosphate (NTPs), einen passiven Referenzfarbstoff und verschiedene Pufferkomponenten. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

cDNA-Template	1 µl
FastStart SYBR green Master Mix	5 µl

Primer fw (10 µM)	1 µl
Primer rv (10 µM)	1 µl
H <sub>2</sub> O	2 µl

Als Referenzgen für die qPCR wurde LADH (Lactat Dehydrogenase) verwendet. LDHA wurde kürzlich (Sadangi et al., 2017) als stabiles Referenzgen für qPCR-Analysen in dem verwendeten Modell empfohlen.

Für die qPCR wurden Primer mit folgenden Sequenzen genutzt.

#### **GRB2:**

Fw: 5'-AGCGCTCCTGGGGATTTCTC-3'

Rv: 5'-CCAAGCCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGATTCCGGTTCATGGGGTGAC-3'

#### **AZIN**

Fw: 5'-CCGTTATCTCACGGCGAACT-3'

Rv: 5'-CTAGGTTCCCAAGGTGGCTC-3'

#### **KRAS**

Fw: 5'-AGAGTGCCTTGACGATACAGC-3'

Rv: 5'-TCCCTCATTGCACTGTACTCC-3'

#### **MAPK8**

Fw: 5'-ATTTGGAGGAGCGAACTAAG-3'

Rv: 5'-ATTGACAGACGGC-GAAGA-3'

#### **LADH**

Fw: 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3'

Rv: 5'-GGGCCATCCACAGTCTTCTG-3'

Die qPCR wurde in einem Step One Plus Gerät von Applied Biosystems durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der  $\Delta\Delta CT$ -Methode. Der CT („cycle threshold“)-Wert gibt den Amplifikationszyklus an, in welchem ein festgelegter Grenzwert überschritten wird. Zunächst wird die Differenz zwischen dem CT-Wert des gemessenen Ziels und einer endogenen Kontrolle gebildet ( $\Delta CT$ ). Dann wird die Differenz der  $\Delta CT$  zu dem mittleren  $\Delta CT$  der Kontrollratten bestimmt ( $\Delta\Delta CT$ ). Dieser Wert wird in die folgende Gleichung eingesetzt um die Expressionsveränderung gegenüber der Kontrolle zu bestimmen:

$$\frac{Expression}{Expression (Kontrolle)} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

### 3.5. Versuchsablauf

7 Tage nach der beschriebenen Operation wurde bei allen Ratten die PPS nach dem 30-30-8 Modell durchgeführt. Hierbei erfolgt eine bilaterale elektrische Stimulation des PP für jeweils 30 min an Tag 1 und Tag 2 sowie für 8 h an Tag 3. Der Tag nach der letzten (8 h) Stimulation wurde für die EEG Analyse als „Tag 1“ bezeichnet.

Die Ratten, bei denen der Effekt der DBS auf die Epileptogenese gemessen werden sollte, wurden ab Tag 1 für 7 Tage (bzw. für 14 Tage im Falle der VHC) stimuliert. Nach Abschluss der DBS wurde die Ratte für weitere 83 Tage abgeleitet und dann zur Gewebeentnahme perfundiert.

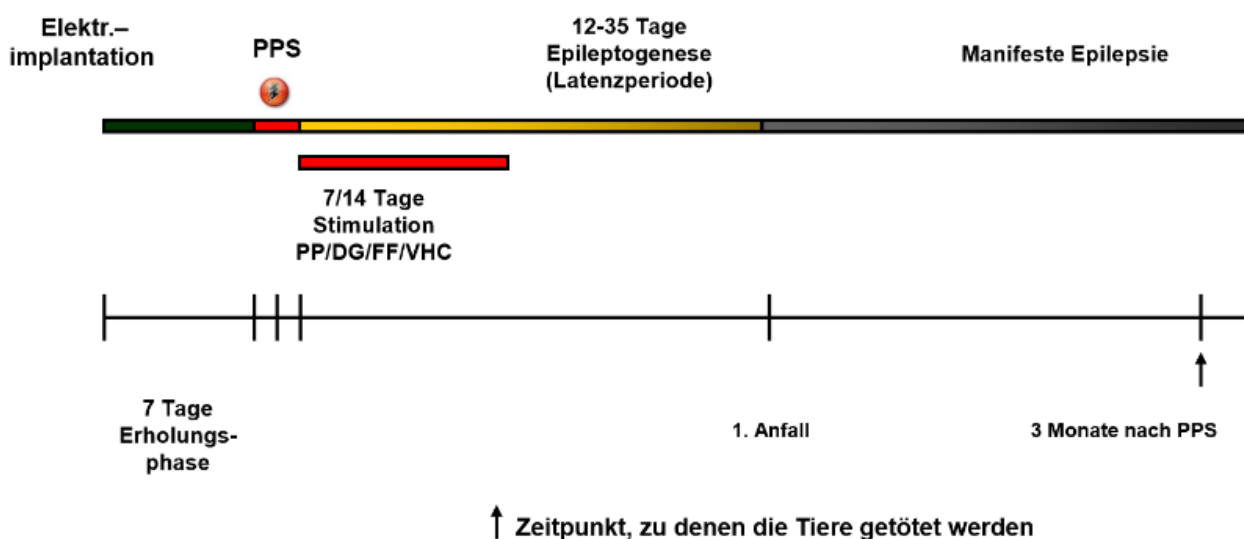


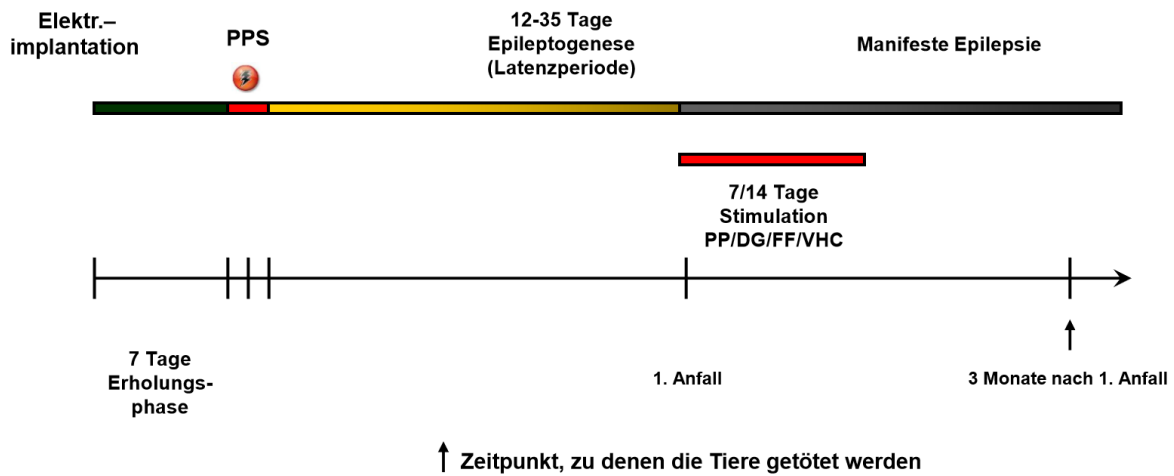
Abbildung 5 Zeitverlauf des ersten Versuchsteils zur Evaluierung der antiepileptogenen Wirkung der DBS einen Tag nach 8 stündiger PPS. PP: Tractus Perforans, DG: Gyrus Dentatus, FF: Fimbria-Fornix-Formation, VHC: ventrale hippocampale Kommissur

Die Ratten, bei denen der Effekt einer DBS auf eine bereits manifestierte Epilepsie getestet werden sollte, wurden ab 1 bis 3 Tage nach Auftreten des ersten Anfalls für 7 Tage (FF/PP/DG-Stimulation) oder für 14 Tage (VHC-DBS) stimuliert. Auch diese Ratten wurden nach Ende der Stimulation für 83 weitere Tage abgeleitet und anschließend für die Gewebeentnahme perfundiert.

Um eine Gruppengröße festzulegen, wurde eine Fallzahlberechnung anhand der in Norwood et al. (2010) validierten Daten durchgeführt. Dabei wurde von einer mittleren Latenzperiode von  $21,5 \pm 3,7$  Tagen ausgegangen. Eine Verlängerung der Epileptogenese um 5 Tage wurde als klinisch relevant angesehen. Mit  $\alpha=0,05$  und einer Power von  $\beta=0,8$  ergab ein zweiseitiger t-Test eine Gruppengröße von  $n=6$ . Für die Fallzahlberechnung für die Validierung des Effekts auf die Anfallsfrequenz wurden von  $4 \pm 2$  Anfällen/Woche und einer relevanten Reduktion der Anfallsfrequenz von 4/Woche



auf 1/Woche ausgegangen. Mit  $\alpha=0,05$  und einer Power von  $\beta=0,8$  ergab ein zweiseitiger t-Test eine Gruppengröße von  $n=5$ .



*Abbildung 6 Zeitverlauf des zweiten Versuchsteils zur Evaluierung der krankheitsmodifizierenden Wirkung der DBS einen bis drei Tage nach dem ersten spontanen Anfall. PP: Tractus Perforans, DG: Gyrus Dentatus, FF: Fimbria-Fornix-Formation, VHC: ventrale hippocampale Kommissur*

Da die VHC-DBS während der Epileptogenese als wirksamstes Paradigma identifiziert wurde, wurden je 3 Hippokampi der VHC-DBSsgruppe aus dem ersten Versuchsteil und der VHC-Kontrollgruppe für die Sequenzierung verwendet. Um den Effekt der DBS auf die miRNA-Expression untersuchen zu können ohne einen Einfluss von Langzeitfolgen auftretender Anfälle oder pathologischer Prozesse zu berücksichtigen, wurden 2 weitere Gruppen operiert. Diese wurden mit dem effektivsten Stimulationsparadigma (1 V, VHC, direkt nach PPS) stimuliert und dann unmittelbar nach der DBS zur Gewebeentnahme perfundiert. Dafür wurden 12 Ratten mit VHC-DBS-Elektroden operiert, die 14 Tage nach der PPS perfundiert wurden. Von diesen 12 erhielten 6 eine 14-tägige DBS der VHC. Die übrigen 6 bildeten eine Kontrollgruppe, welche ausschließlich die 30-30-8-PPS, aber keine DBS erhielt. Bei diesen Ratten wurde keine EEG-Ableitung vorgenommen.

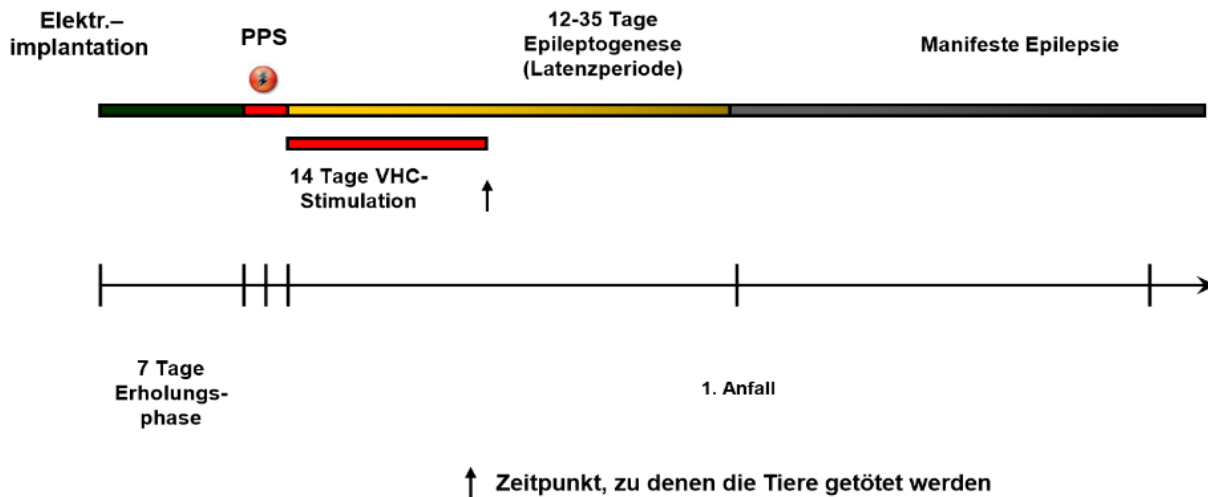


Abbildung 7 Zeitverlauf des Versuchs zur Generierung der Hippokampi für die Evaluierung des direkten Effekts der VHC-DBS mit 1 Hz und 1 V auf die miRNA-Expression mittels miRNA-Sequenzierung.

Vier zusätzliche Ratten wurden verwendet um zu überprüfen, ob Ratten ohne PPS aufgrund der Elektrodenimplantation per se spontane Anfälle entwickeln, da beobachtet wurde, dass Ratten nach der Operation akut symptomatische Anfälle entwickeln können.

Aus dem beschriebenen Versuchsablauf ergeben sich die in Tabelle 4 aufgelisteten Versuchsgruppen.

Tabelle 4: Übersicht der Versuchsgruppen und der jeweiligen Behandlungen.

DBS-Zielstruktur	Kürzel	PPS	Elektroden EEG- implan- tation		Stimulation												Perfusionszeitpunkt	
			FF	VHC	Epileptogenese				Manifeste Epilepsie									
					5 Hz	130 Hz	5 Hz	130 Hz	FF	PP	DG	VHC	130 5	130 5	130 5	DG		VHC
DBS-Frequenz					5 Hz	130 Hz	5 Hz	130 Hz	1 Hz	5 Hz	130 Hz	1 Hz	5 Hz	130 Hz	1 Hz	5 Hz	Tage nach Beginn der DBS	Tage nach der Operation
DBS-Dauer					1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	
					W	1 W	1 W	1 W	1 W	1 W	1 W	1 W	1 W	1 W	1 W	1 W	97 d	0 d 15 d 98 d
Gruppe 1 (n=9)	FF, LF	x	x	x													x	
Gruppe 2 (n=3)	FF, HF	x	x	x													x	
Gruppe 3 (n=5)	PP, LF	x		x													x	
Gruppe 4 (n=4)	PP, HF	x		x													x	
Gruppe 5 (n=2)	DG, LF	x		x													x	
Gruppe 6 (n=2)	DG, HF	x		x													x	
Gruppe 7 (n=1)	VHC, 1 Hz	x		x													x	
Gruppe 8 (n=1)	VHC, 5 Hz	x		x													x	
Gruppe 9 (n=2)	VHC, 130 Hz	x		x													x	
Gruppe 10 (n=6)	VHC; 1 Hz, 2 W	x		x													x	
Gruppe 11 (n=6)	VHC, 1 Hz, sequ.	x		x														x
Gruppe 12 (n=6)	FF, LF	x	x	x													x	
Gruppe 13 (n=3)	FF, HF	x	x	x													x	
Gruppe 14 (n=2)	PP, LF	x		x													x	
Gruppe 15 (n=2)	PP, HF	x		x													x	
Gruppe 16 (n=2)	DG, LF	x		x													x	
Gruppe 17 (n=2)	DG, HF	x		x													x	
Gruppe 18 (n=2)	VHC, 1 Hz	x		x													x	
Gruppe 19 (n=5)	VHC, 1 Hz, 2 W	x		x													x	
Gruppe 20 (n=5)	PP-Kontrolle	x		(x) 3 von 5													x	
Gruppe 21 (n=7)	FF-Kontrolle	x	x	x													x	
Gruppe 22 (n=4)	VHC-Kontrolle	x	x	x														x
Gruppe 23 (n=6)	VHC-Kontrolle, sequ. x	x		x														
Gruppe 24 (n=3)	ohne PPS			x														x
Gruppe 25 (n=3)	ohne Anfälle	x		x														x
Gruppe 26 (n=3)	VHC Test			x													x	
Gruppe 27 (n=12)	FF Test	x																x

Für die Sequenzierung wurden je 3 Ratten der Gruppe 10 und 22 und 6 Ratten der Gruppen 11 und 23 verwendet. Außerdem wurden je 3 Ratten der Gruppe 25, die trotz PPS keine spontanen Anfälle hatten, sequenziert. Zwei dieser Ratten hatten akut symptomatische Anfälle nach der Elektrodenimplantation und nach der PPS. Von der Gruppe 24 (ohne PPS) wurden ebenfalls 3 Hippokampi sequenziert, diese erhielten keine PPS und hatten trotzdem akut symptomatische Anfälle, jedoch keine spontanen Anfälle.

Zusätzlich zu den hier beschriebenen Versuchen werden Daten aus einem vorherigen Versuch mit demselben Tiermodell als Vergleichswerte herangezogen (EpimiRNA-Projekt, unveröffentlichte Daten). Dabei wurde das PPS Paradigma angewandt, die Ratten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten perfundiert. Die Hippokampi wurden hinsichtlich der miRNA-Expression sequenziert. Die gemessenen „reads per million“ (RPM) sind Log2 transformiert. Dadurch bedeutet eine Zunahme um eine Einheit im Boxplot einen Verdopplung beziehungsweise eine Verkleinerung um eine Einheit eine Halbierung der gemessenen RPM. Die Ratten wurden zu folgenden Zeitpunkten perfundiert: 1 h/1 d/3 d/10 d/16 d nach der PPS und 1 d/1 Monat nach dem ersten Anfall. Als Kontrollgruppe dienen unstimulierte Ratten mit implantierten PP-Stimulationselektroden, die 17 Tage nach Elektrodenimplantation perfundiert wurden.

### 3.6. Auswertung und Statistik

#### 3.6.1. Statistik

Um den antiepileptogenen Effekt der verschiedenen Stimulations-Paradigmen zu evaluieren, wurde die Latenzperiode der Gruppen verglichen. Dabei wurden als Kontrollgruppe jeweils alle Ratten mit gleicher Behandlung, also gleicher Lokalisation implantierter Elektroden verwendet. Beispielsweise wurde die Latenzperiode von Gruppe 1 mit den Latenzperioden der Ratten aus Gruppe 12 und 13 sowie denen aus Gruppe 21 verglichen. Da die Ratten aus den Gruppen 12 bis 19 erst nach Auftreten des ersten Anfalls die DBS erhielten, konnten diese als Kontrollgruppe verwendet werden. Um den krankheitsmodifizierenden Effekt durch DBS nach Auftreten des ersten Anfalls zu evaluieren, wurde die Anfallsfrequenz nach der DBS zwischen den Gruppen verglichen. Dafür wurden Kontrollratten operiert, die entweder ausschließlich PP-Stimulationselektroden implantiert hatten (Gruppe 20 als Kontrolle für Gruppe 15 und 16), zusätzlich FF-Stimulationselektroden implantiert hatten (Gruppe 21 als Vergleichsgruppe für Gruppe 12 und 13) oder zusätzlich VHC-DBS-Elektroden implantiert hatten (Gruppe 22 als Kontrolle für Gruppe 19). Als Kontrollgruppe für die DG-Stimulation wurden Ratten die nur PP-Stimulationselektroden implantiert hatten

verwendet (Gruppe 20). Dadurch wurden Ratten für eine weitere Kontrollgruppe eingespart, da angenommen wurde, dass es bei der Implantation von DG-Stimulationselektroden nicht zu einer zusätzlichen Läsion im Bereich des Papez-Kreises kommt.

Für den Vergleich der Anfallsfrequenzen wurden nur Ratten ausgewertet, die mindestens 30 Tage nach der DBS abgeleitet wurden um einen Scheineffekt durch steigende Anfallsfrequenzen bei langer Ableitperiode zu vermeiden. Für die Latenz wurden ebenfalls nur Ratten in der Auswertung berücksichtigt, die mindestens 30 Tage abgeleitet wurden. Endete die Ableitperiode nach über 30 Tagen aber vor dem ersten Anfall wurde der letzte Tag der Ableitperiode als Ende der Latenzperiode angenommen. So wurde vom schlecht möglichsten Outcome für die Behandlungsgruppen ausgegangen um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Zusätzlich zum krankheitsmodifizierenden Effekt wurde der antikonvulsive Effekt der Stimulationsparadigmen anhand der Anfallsfrequenz während der DBS untersucht. Dafür wurden die gleichen Kontrollgruppen verwendet, wie für die Untersuchung des krankheitsmodifizierenden Effekts.

Da aufgrund der geringen Gruppengröße keine Normalverteilung innerhalb der Gruppen angenommen werden konnte, erfolgte die statistische Auswertung mittels des nicht-parametrische Mann-Whitney-U Tests. Eine Anpassung für multiples Testen wurde nicht durchgeführt.

Um zu untersuchen, ob das Auftreten akut symptomatischer Anfälle nach der Elektrodenimplantation oder nach der PPS einen Einfluss auf die Latenzperiode hat, wurden alle Kontrollratten in zwei Kategorien unterteilt: Ratten mit akut symptomatischen Anfällen nach der Operation und/oder nach der PPS; Ratten ohne akut symptomatische Anfälle. Für die Untersuchung der Korrelation von Anfallsfrequenz und dem Auftreten akut symptomatischer Anfälle, wurden nur Kontrollratten ausgewertet, da durch unterschiedliche Stimulations-Paradigmen der Behandlungsgruppe ein Effekt nicht eindeutig zu validieren wäre. Außerdem wurde getestet, ob das Auftreten akut symptomatischer Anfälle mit der Anzahl und Position implantierter Elektroden korreliert.

Die Auswertung der miRNA-Sequenzierung erfolgte mit dem Statistik-Programm „R“ mittels speziell für diesen Zweck erstellter Skripte, bereitgestellt von Dr. M. Venø (Universität Aarhus, iNANO). Die gemittelte Anzahl der Amplifikate einer miRNA wurden zunächst RPM normalisiert. Die Zahl gibt also an, in wie vielen der durchgeführten „reads“ diese miRNA gezählt wurde:  $\text{counted reads/reads in total} \times 1.000.000$ . Vergleiche zwischen den Gruppen wurden mittels one-way-ANOVA (Analysis of Variance)

durchgeführt und mit dem Benjamin-Hochberg-Test für multiples Testen angepasst. Daraus ergibt sich die „False Discovery Rate“ (FDR). Als signifikant reguliert wurden alle miRNAs betrachtet, die eine FDR von unter 0,05 hatten also innerhalb eines Konfidenzintervalls von 95 % lagen. Die Darstellung erfolgte als Box-Whisker-Plots. Die Kästen zeigen jeweils den Median und die Quartile sowie Minimum und Maximum.

Die signifikant regulierten miRNAs wurden zunächst per Clusteranalyse anhand der Euklidischen Distanz in Gruppen ähnlicher Expressionsmuster eingeteilt. Dafür wurde die „Ward-Methode“ genutzt. Die Expression der Gruppen wurde dafür normalisiert, sodass im Mittel immer eine Expression von 0 gegeben war. Es handelt sich bei der Einteilung um eine p-Wert-unabhängige Methode.

Zusätzlich wurde eine Hauptkomponentenanalyse (Principle component analysis; PCA) erstellt. Dabei werden die gemessenen Daten artifiziell vereinfacht und zweidimensional anhand von Annäherungen an 2 Linearkombinationen dargestellt.

### 3.6.2. miRNA-Target-Analyse

Um mögliche Mechanismen der VHC-DBS zu analysieren, wurde eine Target-Analyse für die als relevant angesehenen miRNAs durchgeführt. Dafür wurden die miRNAs-Sequenzen zwischen den Spezies Ratte, Mensch und Maus verglichen. Die rno-let-7a-1-3p hat kein Equivalent mit der gleichen Sequenz im Menschen. Die hsa-let-7a-3p unterscheidet sich von dieser allerdings nur durch eine Base. Deshalb wurde diese miRNA als Equivalent für die rno-let-7a-1-3p in die Analyse eingeschlossen.

Die regulierten miRNAs wurden hinsichtlich möglicher Ziele und beeinflusster Signalwege analysiert. Die Listen möglichen „miRNA-target-interactions“ (MTIs) wurden mit Hilfe der Datenbank des Royal College of Surgeons Ireland in Dublin erstellt, welche validierte MTIs der Datenbanken „miRTarBase“ (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>), „TarBase V7“ (Vlachos et al., 2015) und „miRecords“ (<http://c1.accurascience.com/miRecords/>) sowie vorhergesagte MTIs von „TargetScan“ ([http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/)) und „miRDB“ ([www.miRDB.org](http://www.miRDB.org)) enthält. Anhand dieser Datenbank wurden verschiedene Werte zur Einstufung der Wahrscheinlichkeit einer Interaktion einer miRNA und einer mRNA erstellt:

1. Pscore = gibt die vorhergesagte MTI an (kombiniert von TargetScan und mirDB)
2. EvType = stark (=qPCR, Western Blot oder Reporter-gen-Assay, definiert auf miRTarBase)
3. Cnt = Anzahl der Publikationen assoziiert mit einem validierten MTI

4.  $V\_score$  = gibt die validierte MTI an (0 = 0 Publikationen, 0.5 = 1 Publikation, 1 = 2 Publikationen; 1.5 = 3 oder mehr Publikationen)
5.  $F\_score = P\_score + V\_score$

Dr. Niamh Connolly aus der Arbeitsgruppe „Centre for Systems Medicine“ unter der Leitung von Prof. Jochen Prehn erstellte MTI-Tabellen und Graphiken mittels der Cytoscape Software. Dafür wurden zunächst alle mRNAs abgebildet, die einen rno\_ und hsa\_Pscore von >0,55 beziehungsweise 0,45 oder 0,5 haben. Es wurden unterschiedliche Grenzwerte für die Graphiken benutzt, da nur eine begrenzte Anzahl an MTI dargestellt werden kann, und da abhängig von den analysierten miRNAs unterschiedlich viele MTI den ausgewählten Kriterien entsprachen. Für die dargestellten mRNAs wurden anschließend auch MTI mit anderen der analysierten miRNAs mit einem PScore >0,1 abgebildet. Die Stärke der Verbindungslinien korreliert dabei mit dem kalkulierten Pscore, wodurch MTI mit einem hohen Pscore hervorgehoben werden. Die Farbe der Verbindungslinien indiziert die Spezies, in der die Interaktion vorhergesagt wurde. Die zusätzlichen Kriterien (2-4) wurden in den Graphiken nicht berücksichtigt, sind allerdings für die Interaktionen der untersuchten mRNAs mit der miRNA-433-3p in Tabelle 7 angegeben.

Außerdem wurde eine Signalweganalyse mit der DIANA Tool-Software erstellt. Dabei wurde der microT-CDS Algorithmus verwendet, welcher neben der 3'UTR die kodierenden Sequenzen (CDS) der mRNAs in die Suche sogenannter miRNA-recognition-elements (MREs) einbezieht, da die CDS als zusätzliche Ziele von miRNAs ausgemacht wurden (Guo et al., 2015). Neben der Komplementarität der Sequenzen werden Parameter wie die Konservierung einer Sequenz und die freie Energie der miRNA:MRE Interaktion in die Analyse berücksichtigt (Riffo-Campos et al., 2016). Die Signalweganalyse wurde mit einer p-Wert Grenze von 0,01 und einem MicroT-Grenzwert von 0,8 durchgeführt. Ein MicroT-Grenzwert von 0,8 ergibt eine durchschnittliche Angabe von 350 Ziel-mRNAs (Vlachos et al., 2012).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Anzahl der verwendeten Ratten

Die Aufteilung der insgesamt 162 operierten Tiere auf die Gruppen mit verschiedenen Stimulationsparadigmen ist in Abbildung 8 dargestellt.

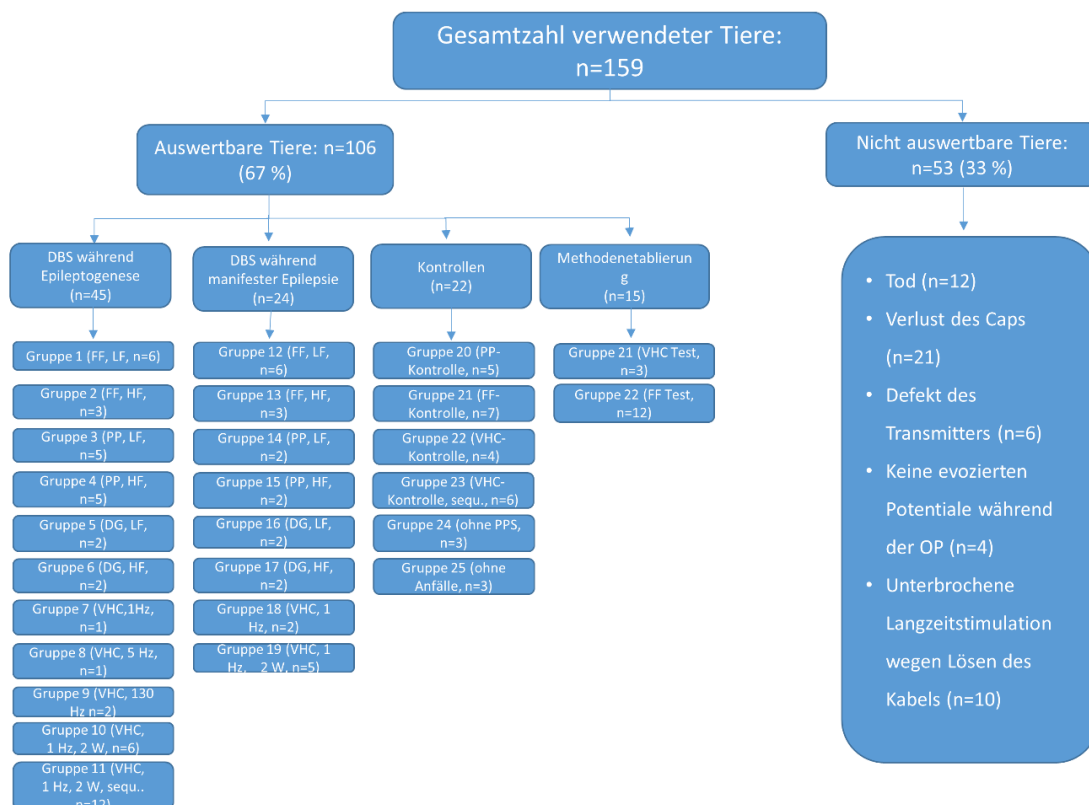


Abbildung 8 Anzahl der verwendeten Tiere für die Versuchsgruppen.

Die Stimulation der VHC für eine Woche während der Epileptogenese führte bei den ersten Ratten (n=1 mit 1 Hz und 5 Hz, n=2 mit 130 Hz) zu kurzen Latenzen (VHC 5 Hz: 13 d; VHC 1 Hz: 25 d, VHC, 130 Hz: 22,5 d). Nach der VHC-Stimulation während der manifesten Epilepsie mit 1 Hz trat eine hohe Anfallsfrequenz auf (0,39/d). Deshalb wurden für die VHC-DBS nur mit dem 2-wöchige Stimulationsparadigma mit 1 Hz und 1 V (Gruppe 10) weitere Ratten behandelt.



## 4.2. Evozierte Potentiale

Während der Operation zur Evaluierung der korrekten Elektrodenposition wurden evozierte Potentiale aus dem DG abgeleitet. Sowohl durch Stimulation der FF (Abbildung 9 A) als auch der VHC (Abbildung 10 A) wurden 3teilige Potentiale evoziert. Diese dienten als Referenzen während der Operationen der Versuchstiere. Der erste positive „Peak“ hatte eine Latenz von etwa 2,5 ms.

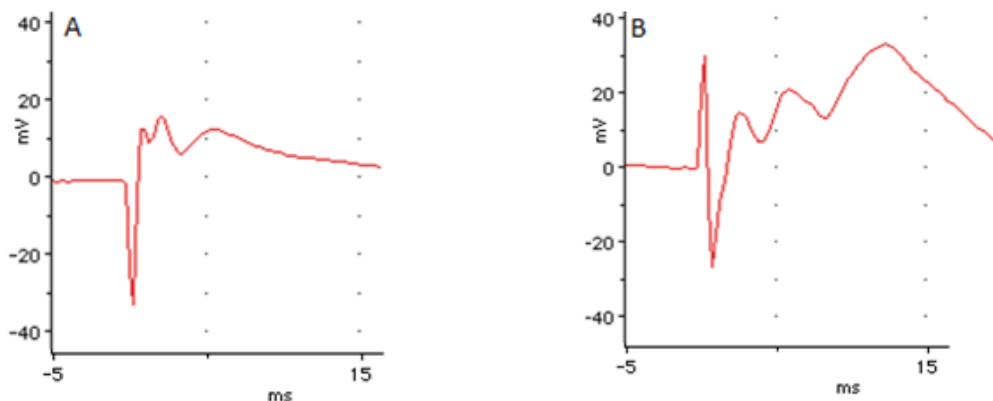


Abbildung 9 Evozierte Potentiale bei FF-Stimulation

**A** Evoziertes Potential während der Operation zur Evaluierung der korrekten Elektrodenposition für die FF-Stimulation abgeleitet aus dem DG. Dieses Potential diene als Referenz für weitere Implantationen von FF-Stimulationselektroden. **B** Evoziertes Potential einer der Versuchsratten während der Stimulation der FF bei Elektrodenimplantation abgeleitet aus dem DG.

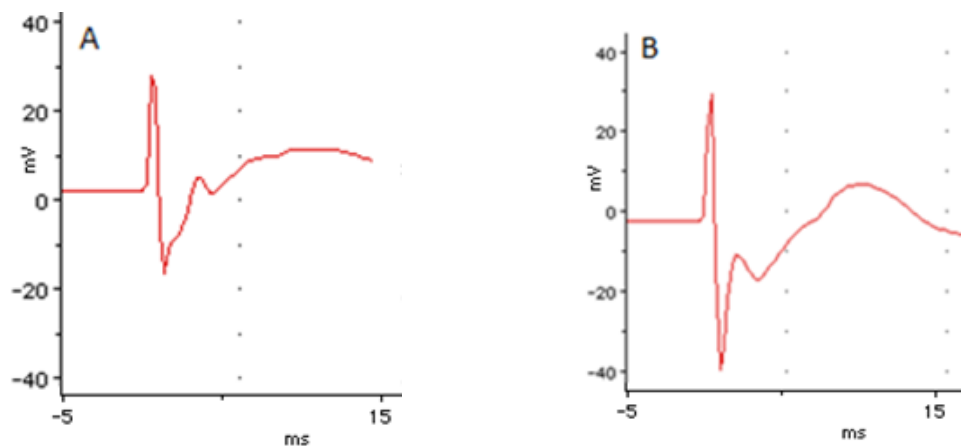


Abbildung 10 Evozierte Potentiale während VHC-DBS

**A** Evoziertes Potential während der Operation zur Evaluierung der korrekten Elektrodenposition für die VHC-DBS abgeleitet aus dem DG. Dieses Potential diene als Referenz für weitere Implantationen von VHC-DBS-Elektroden. **B** Evoziertes Potential einer Ratte aus der Versuchsgruppe während der Stimulation der VHC bei Elektrodenimplantation abgeleitet aus dem DG.

### 4.3. EEG-Muster

Anhand der EEG-Analyse konnten physiologische Aktivitäten (Abbildung 11) von pathologischen Muster wie Anfällen (Abbildung 12), Polyspikes (Abbildung 13) und Sharp Waves (Abbildung 14) sowie von Artefakten (Abbildung 15) unterschieden werden.

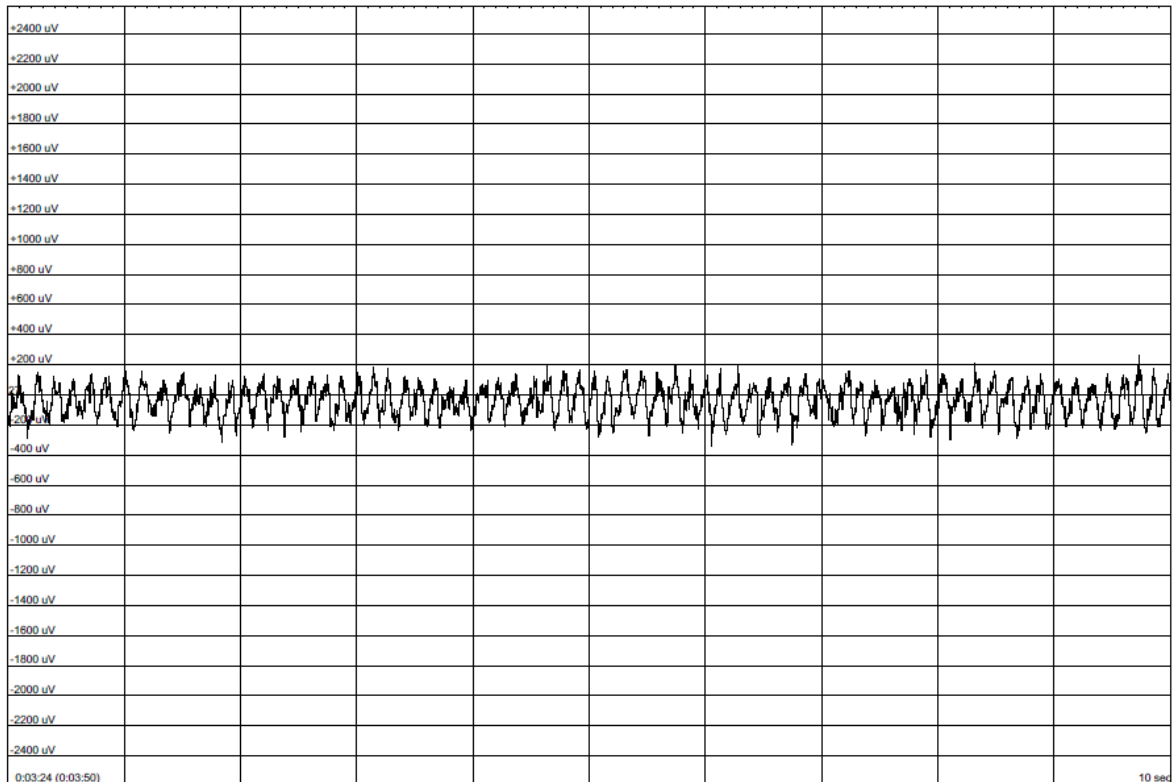
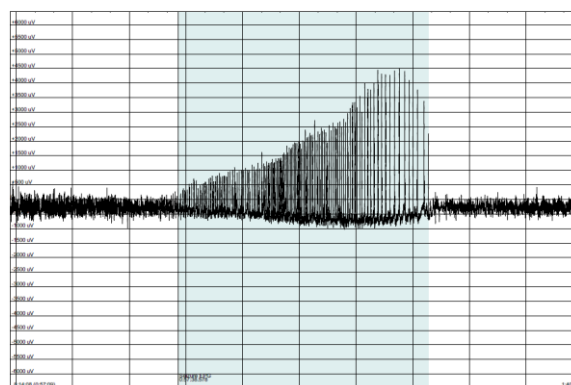


Abbildung 11 Beispiel für physiologische Theta-Aktivität dargestellt mittels EDF-Browser. Das Fenster zeigt einen 10-Sekunden-Abschnitt und eine Amplitude von 4.800 µV.

A



B

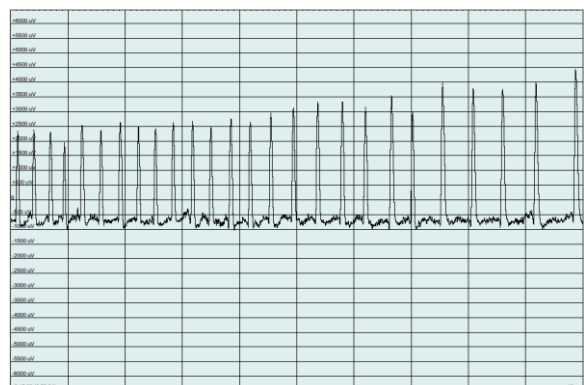


Abbildung 12 Beispiel für einen Anfall dargestellt mittels EDF-Browser.

**A** Das Fenster zeigt einen 1 Minute und 40 Sekunden-Abschnitt und eine Amplitude von 12.000  $\mu\text{V}$ . Der Anfall ist farblich hinterlegt. **B** Das Fenster zeigt einen 10-Sekunden-Ausschnitt aus der Abbildung A.

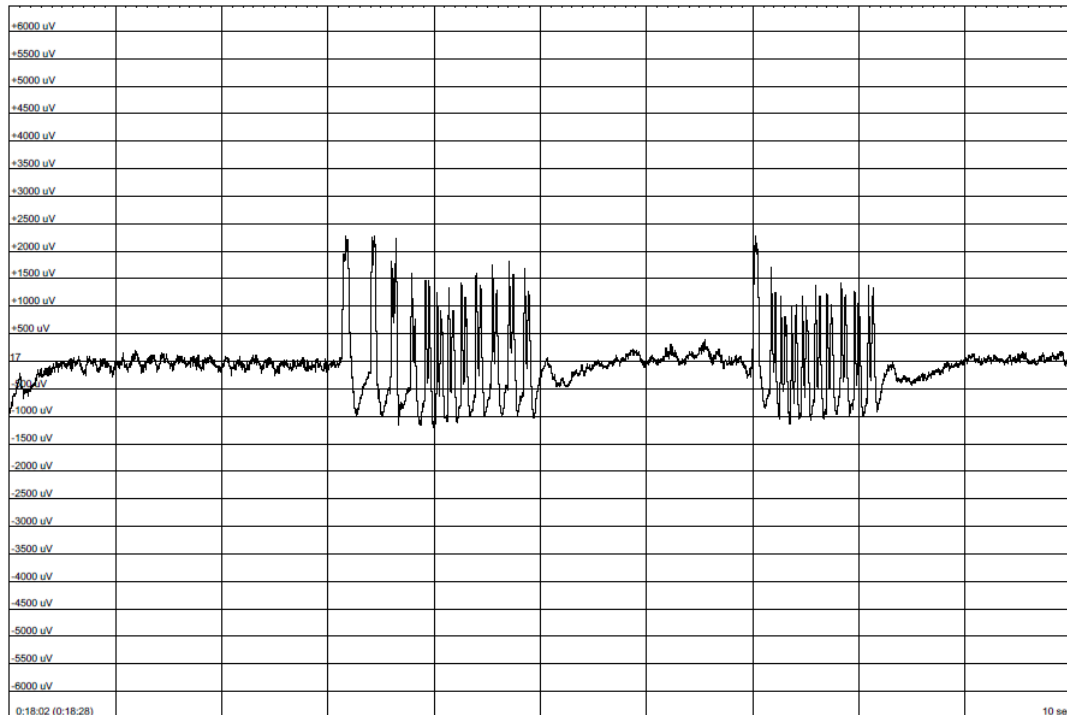


Abbildung 13 Beispiel für Polyspikes dargestellt mittels EDF-Browser.

Das Fenster zeigt einen 10-Sekunden-Abschnitt und eine Amplitude von 12.000  $\mu\text{V}$ .

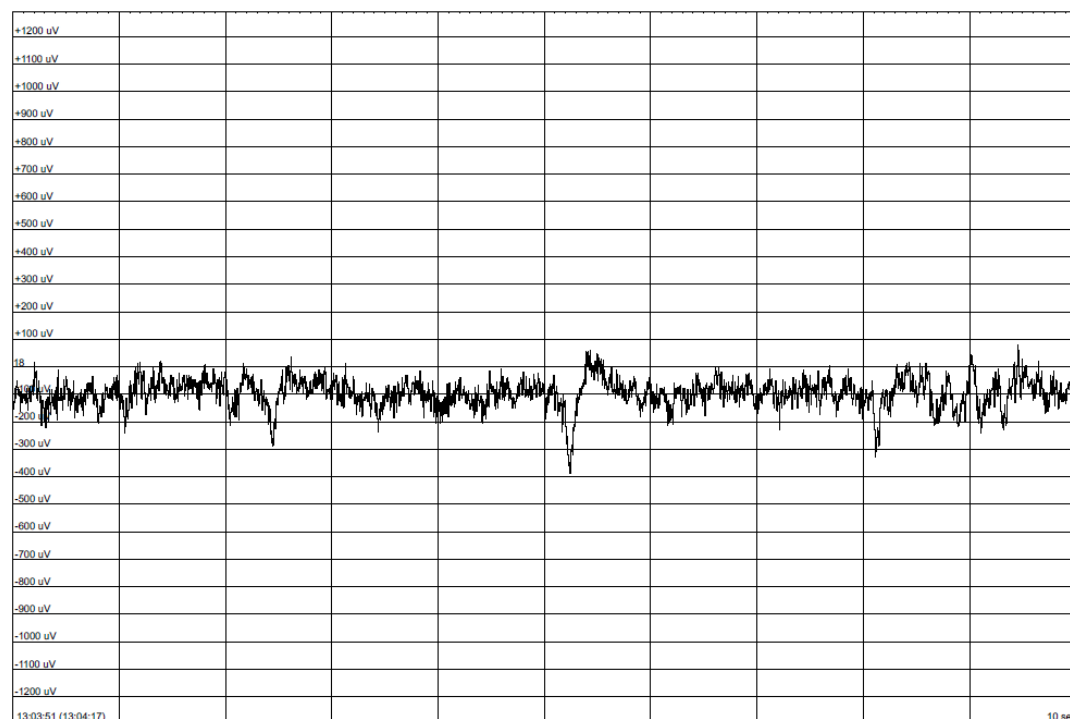


Abbildung 14 Beispiel für „Sharp Waves“ dargestellt mittels EDF-Browser.

Das Fenster zeigt einen 10-Sekunden-Abschnitt und eine Amplitude von 2.400  $\mu\text{V}$ .

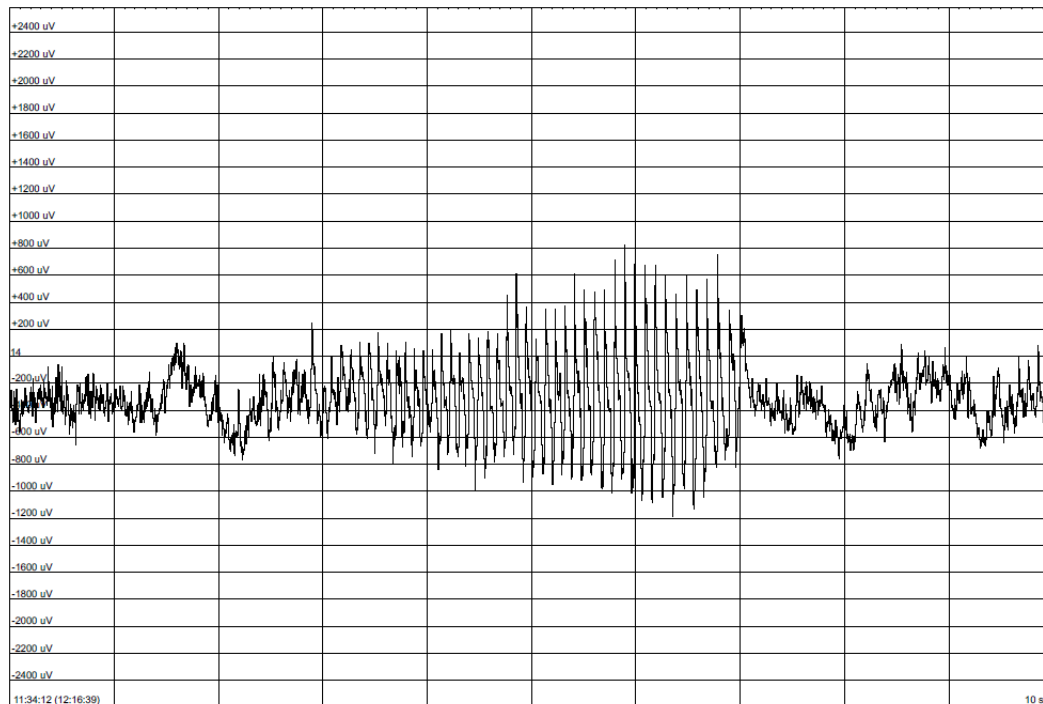


Abbildung 15 Beispiel für Putzartefakte dargestellt mittels EDF-Browser.

Das Fenster zeigt einen 10-Sekunden-Abschnitt und eine Amplitude von 4.800  $\mu\text{V}$ .

#### 4.4. Effekt der DBS auf das Auftreten spontaner Anfälle

##### 4.4.1. Latenzperiode nach DBS während der Epileptogenese

Die Dauer der Latenzperioden unterschied sich nicht signifikant zwischen den Kontrollgruppen (Gruppe 20, 21 und 22). Die kontinuierliche VHC-DBS mit 1 Hz und 1 V für zwei Wochen während der Epileptogeneseperiode verlängerte die Latenzperiode signifikant von  $19 \pm 11$  (Gruppe 22) auf  $56 \pm 23$  Tage (Gruppe 10) ( $p=0,004$ ). Alle weiteren untersuchten Stimulationsparadigmen führten nicht zu einer signifikanten Veränderung der Latenzperiode (Abbildung 16).

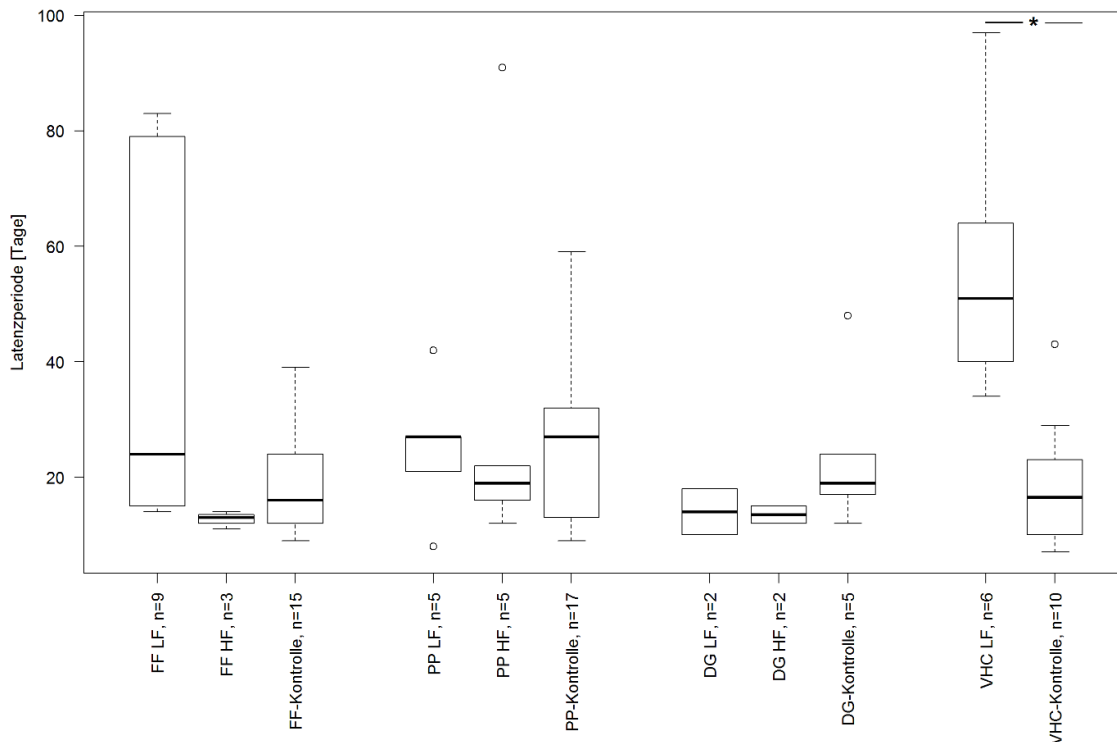


Abbildung 16 Latenzperioden nach Applikation verschiedener DBS-Paradigmen.  
\*  $p=0,004$ .

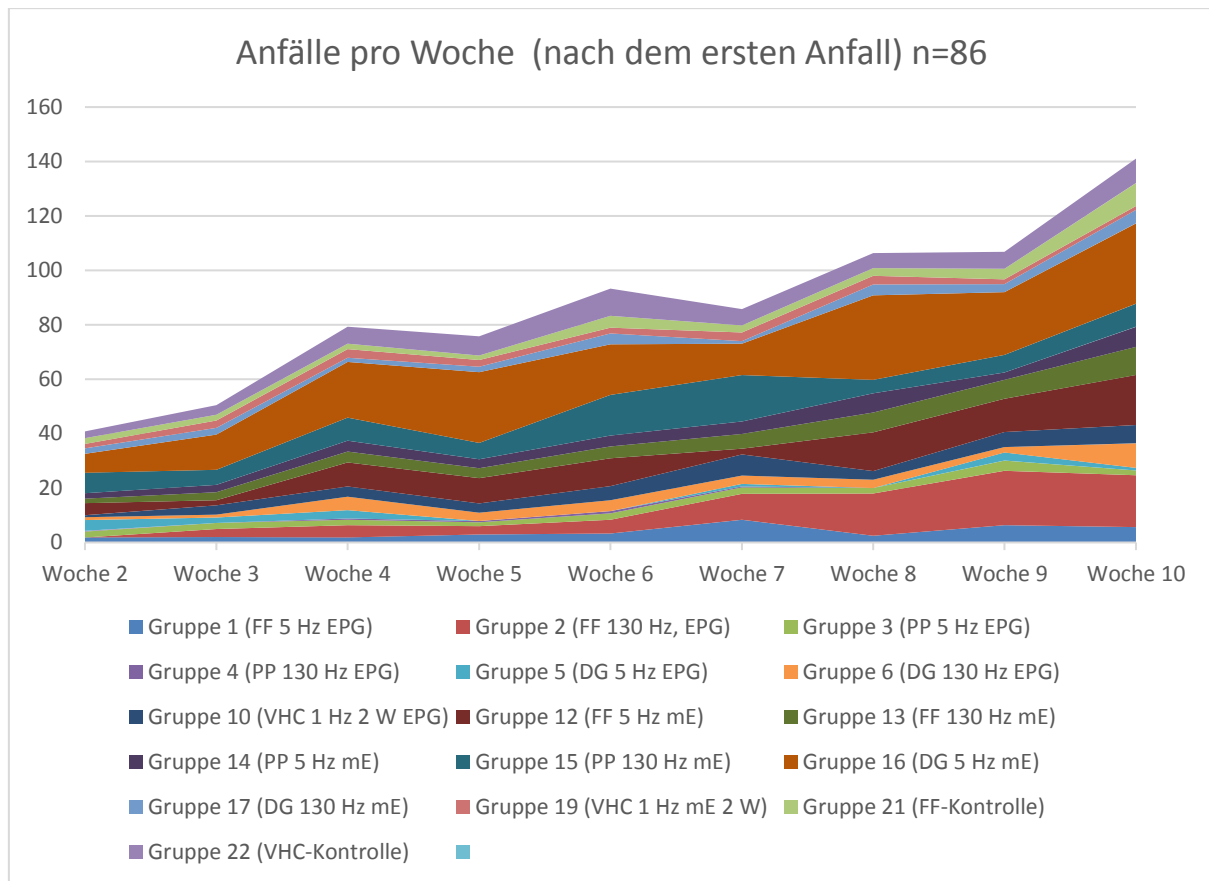
Die Stimulation der FF mit 5 Hz während der Epileptogenese (Gruppe 1) führte bei 3 von 6 Ratten zu einer sehr langen Latenzperiode von  $\geq 30$  Tagen, allerdings zeigten die übrigen 3 Tiere eine besonders kurze Latenzperiode von  $\leq 20$  Tagen, so dass kein signifikanter Gruppeneffekt resultierte.

Die Anfallsfrequenz nach DBS während der Epileptogenese wurde als Nebenparameter betrachtet. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Stimulationsgruppen festgestellt. Gruppe 10 (VHC-DBS) hatte eine Anfallsfrequenz von  $0,9 \pm 1,3/d$ . Gruppe 22 (VHC-Kontrolle) hatte eine Anfallsfrequenz von  $1 \pm 0,8/d$ .

Von den drei sequenzierten Ratten der Gruppe 10 hatte eine keinen Anfall innerhalb der 97-tägigen Ableitperiode, die anderen beiden hatten Latenzperioden von 40 und 34 Tagen. Bei den drei sequenzierten Kontrollratten konnte bei einer wegen eines Transmitter-Defekts keine Latenzperiode festgestellt werden, die anderen beiden Ratten hatten Latenzperioden von 7 und 23 Tagen.

#### 4.4.2. Anfallsfrequenz nach DBS während manifester Epilepsie

Die Anfallsfrequenz nahm mit der Zeit zu (Abbildung 17).



**Abbildung 17 Kumulative Anfallsfrequenz während der Ableitperiode**

*n=58; mE: DBS während manifester Epilepsie; EPG: DBS während der Epileptogenese.*

Die Anfallsfrequenzen der Gruppe 20 (PP-Kontrollgruppe;  $0,35 \pm 0,30/d$ ) und der Gruppe 21 (FF-Kontrollgruppe,  $0,51 \pm 0,25/d$ ) lagen im für das Tiermodell typischen Bereich und unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Dagegen zeigten die Tiere der Gruppe 22 (VHC-Kontrolle) eine für das Modell ungewöhnlich hohe Anfallsfrequenz von  $1,34 \pm 0,76/d$ ; der Unterschied zur Gruppe 20 (PP-Kontrollgruppe;  $p=0,0422$ ) und zur Gruppe 21 (VHC-Kontrollgruppe,  $p=0,02424$ ) sowie zur Gruppe 10 (VHC-DBSsgruppe,  $p=0,01587$ ) war signifikant (Abbildung 18). Dabei lag die Anfallsfrequenz der VHC-DBSsgruppe aber im für das Tiermodell typischen Bereich und unterschieden sich auch nicht signifikant von den FF- und PP-Kontrollgruppen. Die übrigen Stimulationsparadigmen hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Anfallsfrequenz.

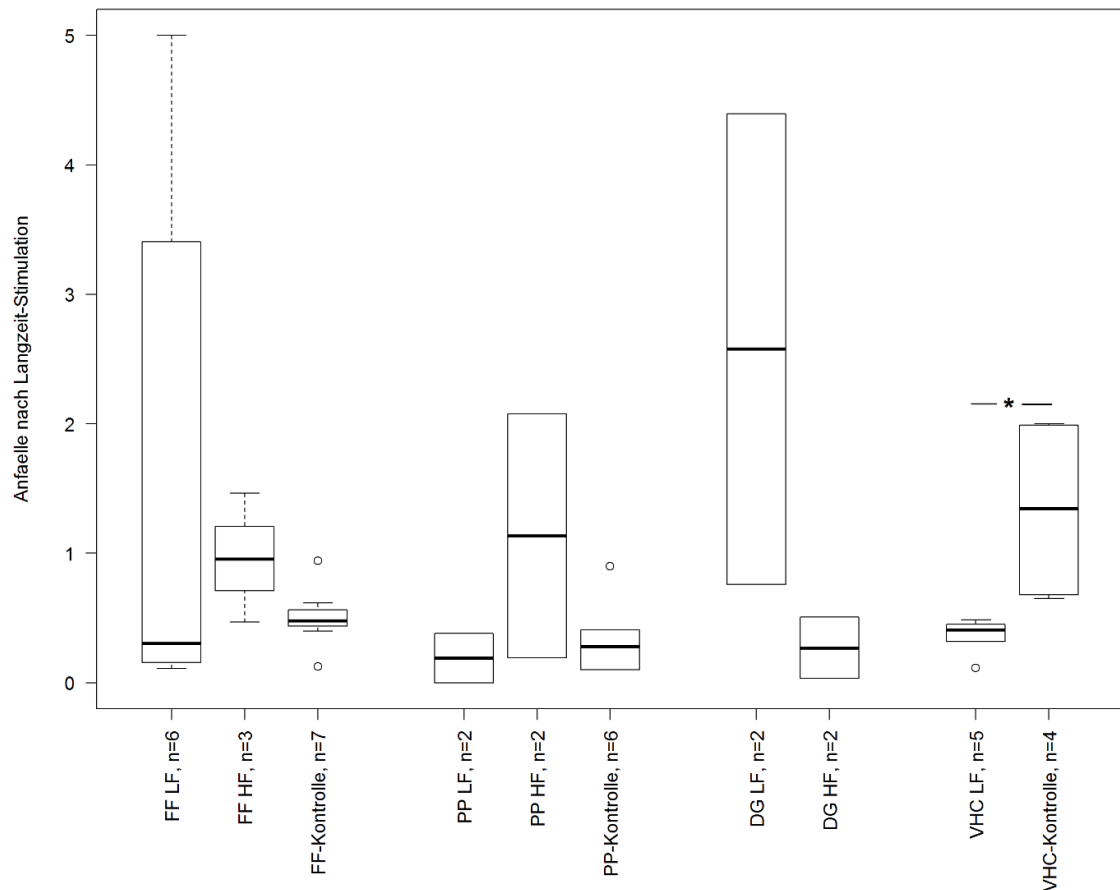


Abbildung 18 Anfallsfrequenz nach DBS während manifester Epilepsie.

Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe wurde nur im Falle der VHC-DBS gemessen. Dabei war die Anfallsfrequenz nach VHC-DBS nicht geringer als in den anderen Gruppen, sondern die VHC-Kontrollgruppe wies eine erhöhte Anfallsfrequenz auf. \*  $p=0,028$

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten akut symptomatischer Anfälle nach Elektrodenimplantation oder PPS und der Latenzperiode (mit akut symptomatischen Anfällen:  $23,9 \pm 19,4$  Tage; ohne akut symptomatische Anfälle:  $22,7 \pm 10,5$  Tage) oder Anfallsfrequenz (mit akut symptomatischen Anfällen:  $1,1 \pm 1,2/d$ ; ohne akut symptomatische Anfälle:  $0,7 \pm 0,5/d$ ) bestand nicht. Das Auftreten akut symptomatischer Anfälle korrelierte nicht mit der Anzahl oder Position implantierter Elektroden.

Die Anfallsfrequenz während der 1-2wöchigen DBS-Periode unterschied sich nicht von der Anfallsfrequenz der Kontrollratten im gleichen Zeitraum (Abbildung 19)

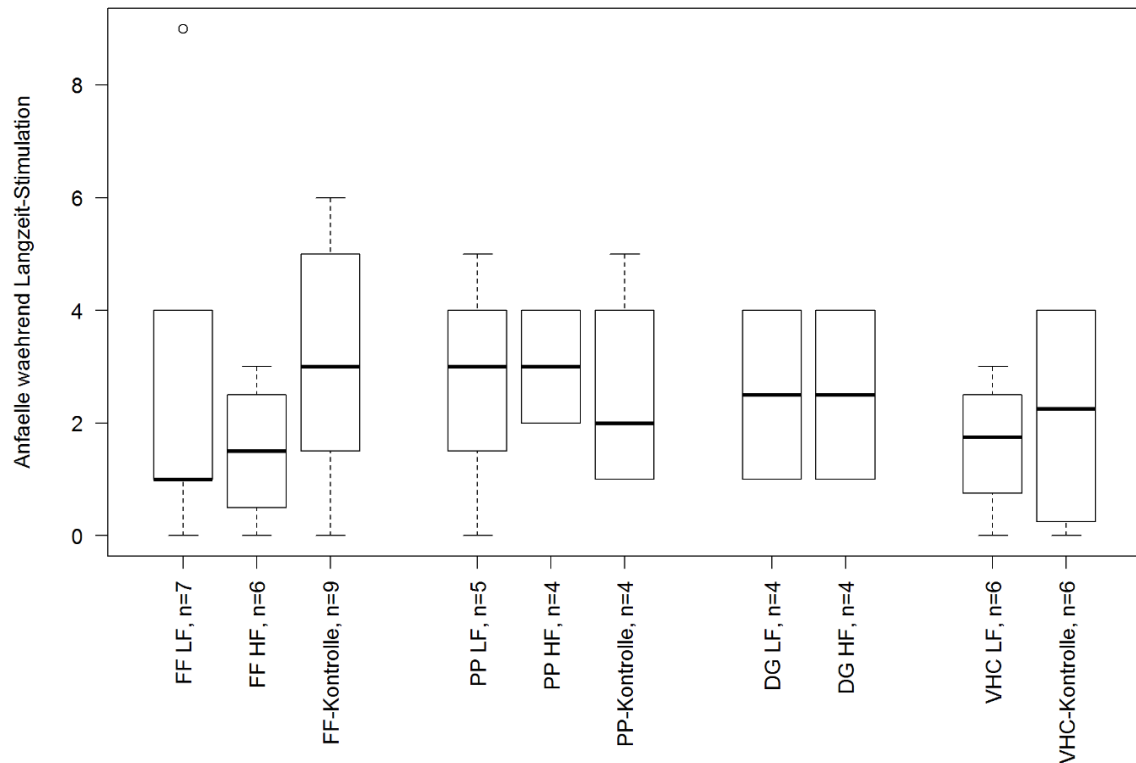


Abbildung 19 Anfallsfrequenz während der DBS.

Es wurde kein signifikanter Unterschied der Anfallsfrequenzen während DBS zwischen den langzeit-stimulierten Ratten und den jeweiligen Kontrollgruppen im gleichen Zeitraum gemessen.

#### 4.5. MikroRNA-Regulation nach VHC-DBS

Für die Auswertung der miRNA-Sequenzierung wurden alle miRNAs berücksichtigt, die mit mindestens 100 RPM detektiert wurden. 200 miRNAs wurden in den Hippokampi detektiert, diese sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: MiRNAs, die in den sequenzierten Hippokampi mit >100 RPM detektierten wurden.

rno-let-7a-1-3p	rno-let-7f-5p	rno-miRNA-125a-5p	rno-miRNA-129-5p
rno-let-7a-5p	rno-let-7g-5p	rno-miRNA-125b-1-3p	rno-miRNA-1298
rno-let-7b-3p	rno-let-7i-5p	rno-miRNA-125b-2-3p	rno-miRNA-130a-3p
rno-let-7b-5p	rno-miRNA-100-5p	rno-miRNA-125b-5p	rno-miRNA-132-3p
rno-let-7c-2-3p	rno-miRNA-101a-3p	rno-miRNA-126a-3p	rno-miRNA-132-5p
rno-let-7c-5p	rno-miRNA-101b-3p	rno-miRNA-126a-5p	rno-miRNA-134-5p
rno-let-7d-3p	rno-miRNA-103-3p	rno-miRNA-127-3p	rno-miRNA-135a-5p
rno-let-7d-5p	rno-miRNA-107-3p	rno-miRNA-127-5p.	rno-miRNA-136-3p
rno-let-7e-5p	rno-miRNA-1224	rno-miRNA-128-3p	rno-miRNA-136-5p
rno-let-7f-2-3p	rno-miRNA-124-3p	rno-miRNA-129-2-3p	rno-miRNA-137-3p



rno-miRNA-138-5p	rno-miRNA-21-5p	rno-miRNA-323-3p	rno-miRNA-450a-5p
rno-miRNA-139-5p	rno-miRNA-218a-5p	rno-miRNA-326-3p	rno-miRNA-485-3p
rno-miRNA-140-3p	rno-miRNA-219a-2-3p	rno-miRNA-328a-3p	rno-miRNA-485-5p
rno-miRNA-142-3p	rno-miRNA-219a-5p	rno-miRNA-329-5p	rno-miRNA-486
rno-miRNA-142-5p	rno-miRNA-221-3p	rno-miRNA-330-5p	rno-miRNA-487b-3p
rno-miRNA-143-3p	rno-miRNA-22-3p	rno-miRNA-335	rno-miRNA-488-3p
rno-miRNA-146a-5p	rno-miRNA-23a-3p	rno-miRNA-337-5p	rno-miRNA-497-5p
rno-miRNA-146b-5p	rno-miRNA-23b-3p	rno-miRNA-338-3p	rno-miRNA-504
rno-miRNA-148a-3p	rno-miRNA-24-2-5p	rno-miRNA-338-5p	rno-miRNA-532-5p
rno-miRNA-148a-5p	rno-miRNA-24-3p	rno-miRNA-340-5p	rno-miRNA-540-3p
rno-miRNA-148b-3p	rno-miRNA-25-3p	rno-miRNA-341	rno-miRNA-541-5p
rno-miRNA-149-5p	rno-miRNA-26a-5p	rno-miRNA-344b-1-3p	rno-miRNA-543-3p
rno-miRNA-150-5p	rno-miRNA-26b-5p	rno-miRNA-345-3p	rno-miRNA-582-3p
rno-miRNA-151-3p	rno-miRNA-27a-3p	rno-miRNA-34b-5p	rno-miRNA-598-3p
rno-miRNA-151-5p	rno-miRNA-27b-3p	rno-miRNA-34c-5p	rno-miRNA-6331
rno-miRNA-153-3p	rno-miRNA-27b-5p	rno-miRNA-351-5p	rno-miRNA-666-3p
rno-miRNA-16-5p	rno-miRNA-28-3p	rno-miRNA-3577	rno-miRNA-667-3p
rno-miRNA-181a-1-3p	rno-miRNA-28-5p	rno-miRNA-361-3p	rno-miRNA-668
rno-miRNA-181a-5p	rno-miRNA-298-5p	rno-miRNA-361-5p	rno-miRNA-671
rno-miRNA-181b-5p	rno-miRNA-29a-3p	rno-miRNA-369-3p	rno-miRNA-672-5p
rno-miRNA-181c-3p	rno-miRNA-29b-3p	rno-miRNA-369-5p	rno-miRNA-674-3p
rno-miRNA-181c-5p	rno-miRNA-29c-3p	rno-miRNA-375-3p	rno-miRNA-676
rno-miRNA-181d-5p	rno-miRNA-300-3p	rno-miRNA-376a-5p	rno-miRNA-708-3p
rno-miRNA-182	rno-miRNA-301a-3p	rno-miRNA-376b-5p	rno-miRNA-708-5p
rno-miRNA-1839-5p	rno-miRNA-3068-3p	rno-miRNA-378a-3p	rno-miRNA-872-3p
rno-miRNA-1843a-3p	rno-miRNA-3085	rno-miRNA-379-3p	rno-miRNA-872-5p
rno-miRNA-1843a-5p	rno-miRNA-3099	rno-miRNA-380-3p	rno-miRNA-873-5p
rno-miRNA-1843b-5p	rno-miRNA-30a-3p	rno-miRNA-384-3p	rno-miRNA-879-5p
rno-miRNA-186-5p	rno-miRNA-30a-5p	rno-miRNA-384-5p	rno-miRNA-92a-3p
rno-miRNA-187-3p	rno-miRNA-30b-5p	rno-miRNA-409a-3p	rno-miRNA-92b-3p
rno-miRNA-191a-5p	rno-miRNA-30c-1-3p	rno-miRNA-410-3p	rno-miRNA-93-5p
rno-miRNA-192-5p	rno-miRNA-30c-2-3p	rno-miRNA-411-5p	rno-miRNA-98-3p
rno-miRNA-195-3p	rno-miRNA-30c-5p	rno-miRNA-423-3p	rno-miRNA-98-5p
rno-miRNA-195-5p	rno-miRNA-30d-3p	rno-miRNA-423-5p	rno-miRNA-99a-3p
rno-miRNA-199a-3p	rno-miRNA-30d-5p	rno-miRNA-425-5p	rno-miRNA-99a-5p
rno-miRNA-19b-3p	rno-miRNA-30e-3p	rno-miRNA-431	rno-miRNA-99b-3p
rno-miRNA-203a-3p	rno-miRNA-30e-5p	rno-miRNA-433-3p	rno-miRNA-99b-5p
rno-miRNA-204-5p	rno-miRNA-31a-5p	rno-miRNA-434-3p	rno-miRNA-9a-3p
rno-miRNA-212-3p	rno-miRNA-320-3p	rno-miRNA-434-5p	rno-miRNA-9a-5p
rno-miRNA-212-5p	rno-miRNA-322-5p	rno-miRNA-448-3p	

Die Heatmap-Analyse zeigt die 100 miRNAs, die in den sequenzierten Hippokampi am stärksten exprimiert waren. Dabei wurde die Probe der Ratte V14\_RH\_1 aufgrund optischer Abweichungen in der Heatmap-Analyse als Ausreißer identifiziert, weshalb diese Probe von den weiteren Analysen ausgeschlossen wurde (Abbildung 20).

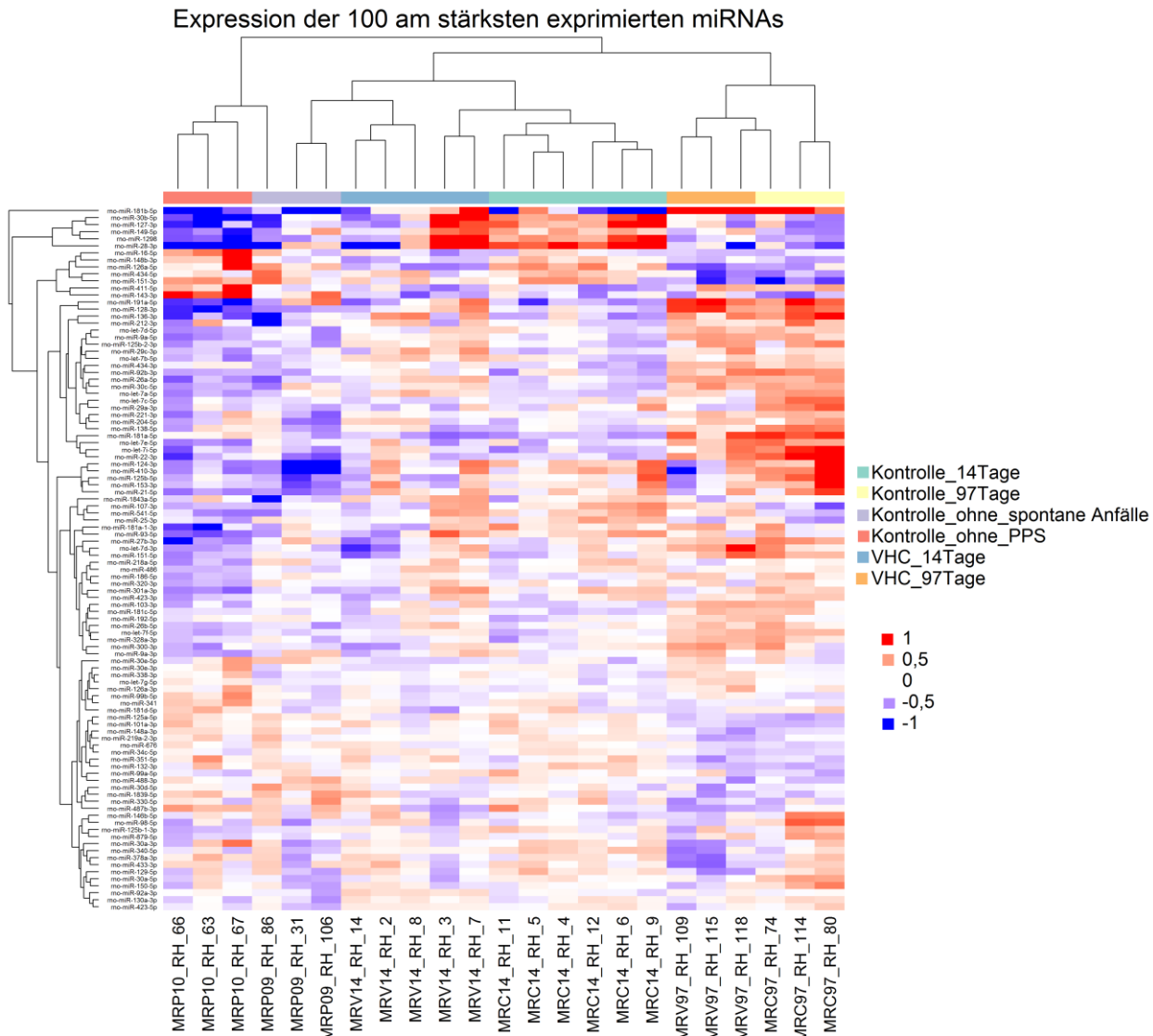
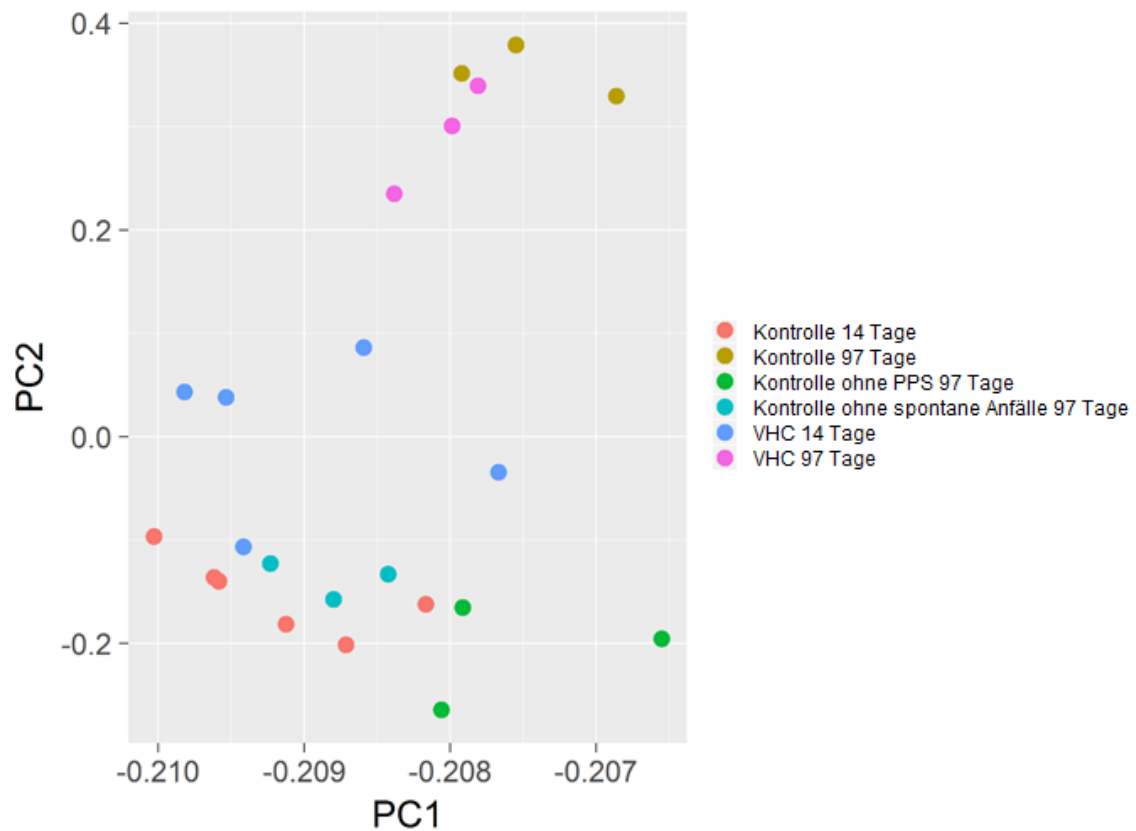


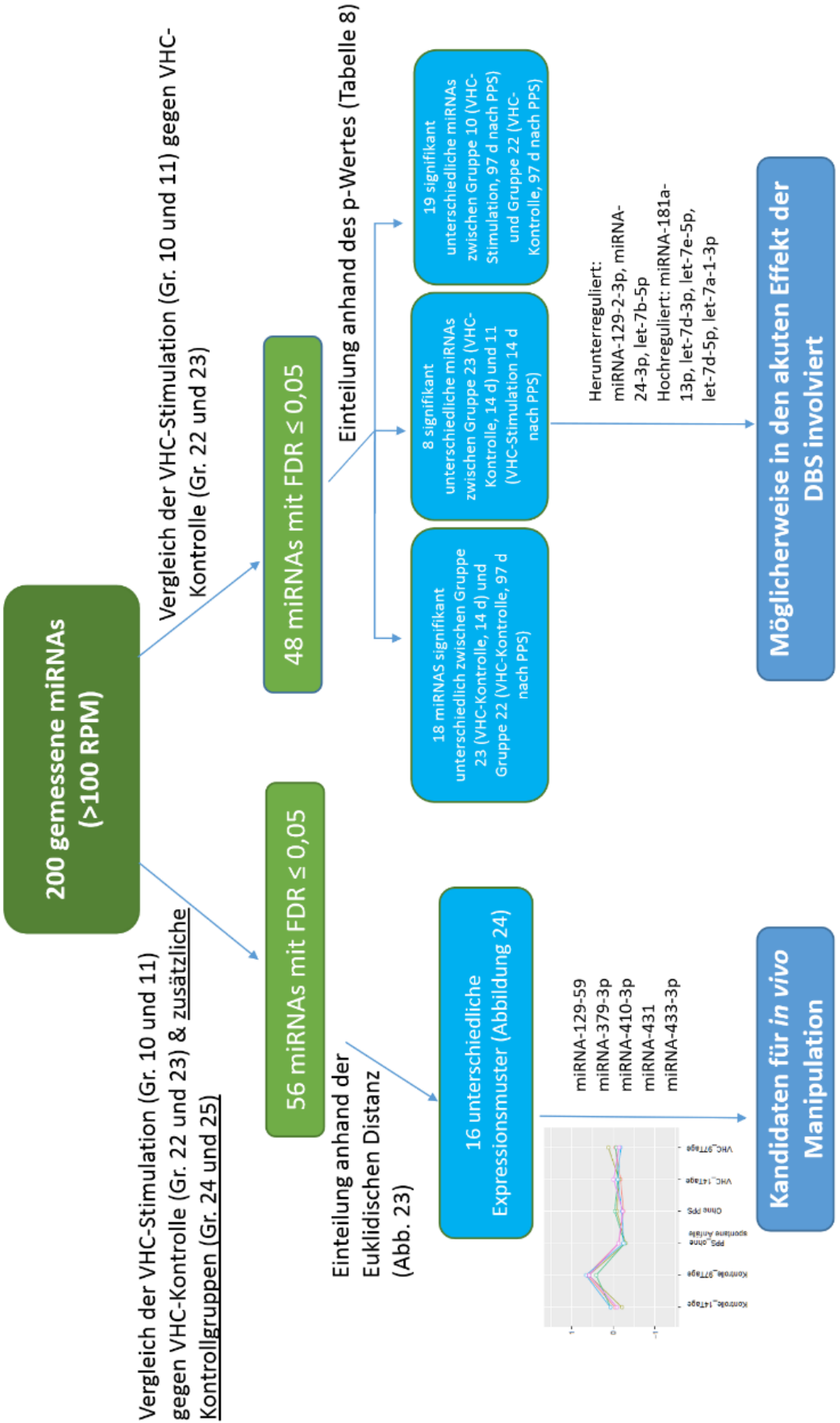
Abbildung 20 Heatmap-Analyse der 100 miRNAs, die in den sequenzierten Hippokampi am stärksten exprimiert waren.

Die V14\_RH\_1 Probe wurde als Ausreißer identifiziert, da sich die miRNA-Expression in dieser Probe stark von der gemessenen Expression in allen anderen Proben unterschied. Abkürzungen: C14: Kontrolle, nach 14 Tagen perfundiert (Gruppe 23), C97: Kontrolle, nach 97 Tagen perfundiert (Gruppe 22); V14: VHC-DBS, nach 14 Tagen perfundiert (Gruppe 11), V97: VHC-DBS, nach 97 Tagen perfundiert (Gruppe 10), RH: Rechter Hippokampus.

Die Hauptkomponentenanalyse, dargestellt in Abbildung 21 zeigt eine Clusterung der verschiedenen Gruppen. Außerdem lassen sich die beiden Kontrollgruppen (ohne PPS

und ohne Anfälle; Gruppe 24 und 25) zusammen mit den frühen Proben (VHC 14 Tage und Kontrolle 14 Tage; Gruppe 11 und 23) von den beiden Gruppen der späten Zeitpunkte (VHC 97 Tage und Kontrolle 97 Tage; Gruppe 10 und 22) abgrenzen. Die VHC-Gruppe 97 Tage nach PPS (Gruppe 10) ist etwas näher an der Kontrollgruppe ohne spontane Anfälle (Gruppe 25), als die Kontrollgruppe 97 Tage nach PPS (Gruppe 22).





*Abbildung 22 Übersicht der Verfahren zur Einteilung der gemessenen miRNAs in Gruppen möglicher relevanter Expressionsmuster.*

Die gemessenen miRNAs lassen sich anhand einer Clusteranalyse (Abbildung 23) in unterschiedliche Expressionsmuster unterteilen (Abbildung 24). Näher betrachtet wurden 5 miRNAs, die aufgrund ihrer Expressionsmusters Kandidaten für eine *in vivo* Manipulation sind. Außerdem wurden 8 miRNAs identifiziert, die direkt nach der VHC-DBS signifikant unterschiedliche Expressionen zwischen der VHC-DBSsgruppe (Gruppe 11) und der Kontrollgruppe (Gruppe 23) aufwiesen. Diese könnten in den akuten Effekt der VHC-DBS involviert sein und werden deshalb im Folgenden näher betrachtet.

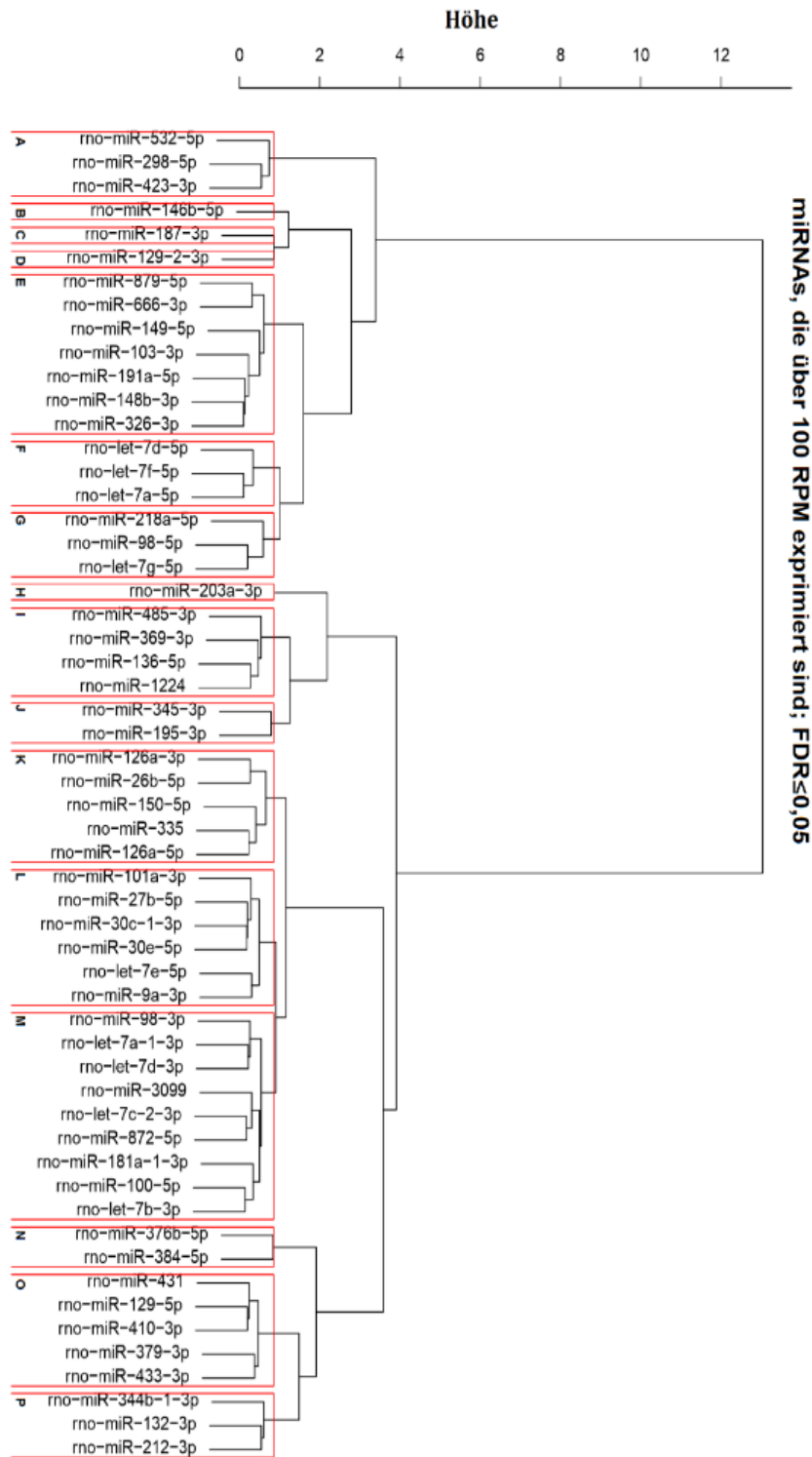
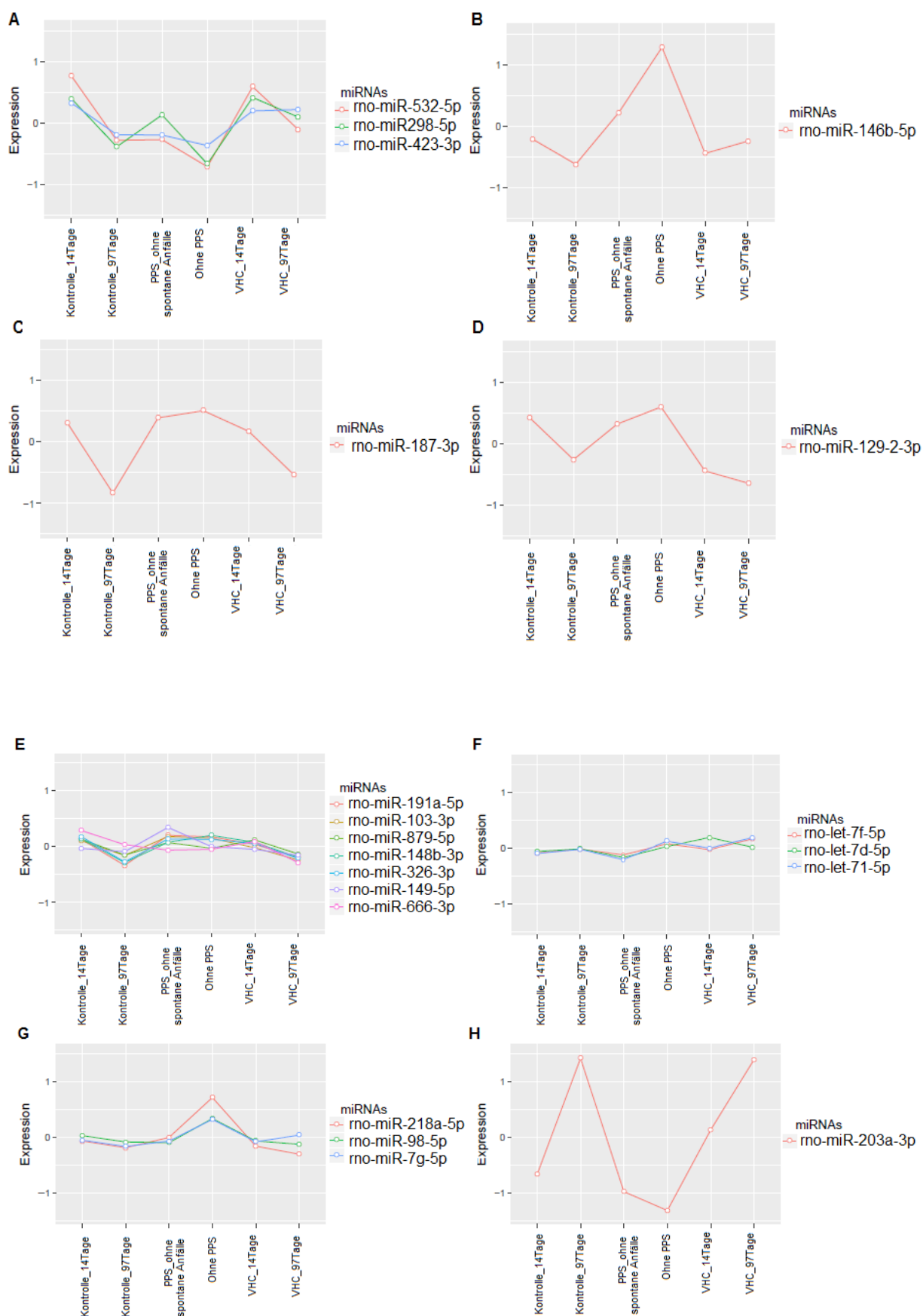


Abbildung 23 Clusteranalyse der signifikant regulierten miRNAs.

Bei dieser Analyse erfolgt eine Einteilung der 56 signifikant regulierten ( $FDR \leq 0,05$ , one-way ANOVA; Benjamin-Hochberg-Test) miRNAs anhand ihres Expressionsmustern in den 6 Gruppen: Gruppe 11 (VHC 14Tage), Gruppe 10 (VHC 97 Tage), Gruppe 23 (Kontrolle 14 Tage), Gruppe 22 (Kontrolle 97 Tage), Gruppe 25 (PPS ohne Anfälle) und Gruppe 24 (ohne PPS). Die Einteilung erfolgte anhand der Euklidische n Distanz.



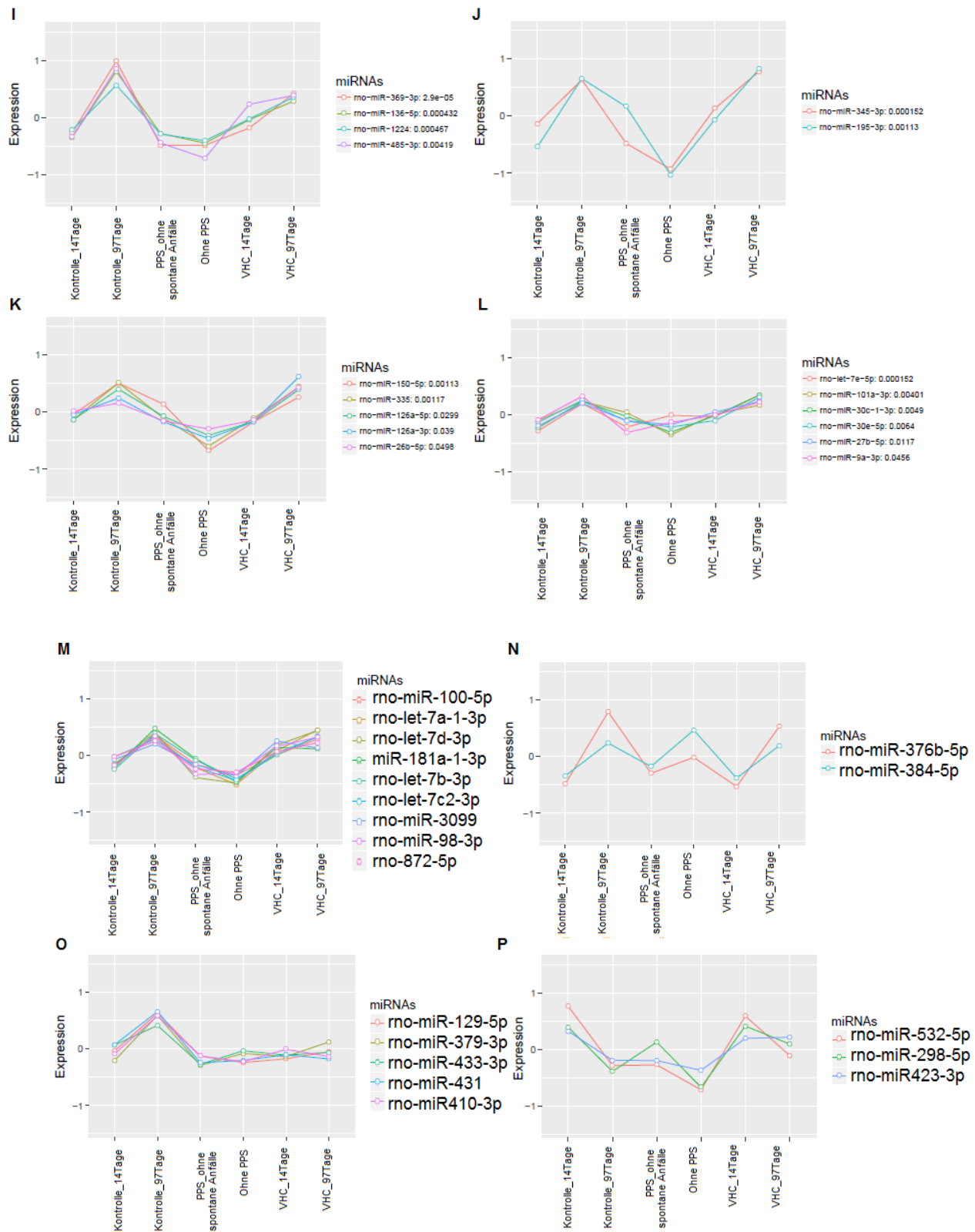


Abbildung 24 Expressionsmuster der signifikant regulierten miRNAs.

Die Expression der sechs Gruppen ist normalisiert, sodass im Mittel immer eine Expression von 0 gegeben ist. Die miRNAs, die als besonders relevant für die Unterdrückung der Epileptogenese mittels VHC-DBS identifiziert wurden, sind in Abbildung F dargestellt. Die Expression der fünf gezeigten miRNAs ist in der Kontrollgruppe nach 14 Tagen (Gruppe 23) verglichen mit den Gruppe 25 (Kontrolle ohne spontane Anfälle) und Gruppe 24 (Kontrolle ohne PPS) leicht erhöht und ist nach



97 Tagen signifikant erhöht. Bei den VHC-stimulierten Ratten (Gruppe 10 und 11) war keine Regulation zu messen.

Die Abbildung 25 bis Abbildung 29 zeigen die Expression der 5 miRNAs, deren Expressionsmuster in Abbildung 24 O dargestellt ist. Diese waren in der Kontrollgruppe nach 14 Tagen (Gruppe 23) leicht hochreguliert und nach 97 Tagen (Gruppe 22) stark hochreguliert und zeigten in den VHC-Gruppen nach 14 (Gruppe 11) und 97 Tagen (Gruppe 10) sowie in den zusätzlichen Kontrollgruppen (Gruppe 24 und 25) keine Regulation. Abbildung 25 B bis Abbildung 29 B zeigt die Expression der gleichen miRNAs im selben Tiermodell während und nach der Epileptogenese (EpimiRNA-Projekt, unveröffentlichte Daten).

MiRNA-129-5p zeigte eine signifikant höhere Expression in der Gruppe 22 (VHC-Kontrolle 97 Tage nach PPS) verglichen mit der Expression in Gruppe 23 (VHC-Kontrolle 14 Tage nach PPS; Abbildung 25 A). Die Expressionswerte während und nach der Epileptogenese ohne DBS im selben Tiermodell bestätigen diese Regulation. Hier wurde eine Hochregulation der miRNA-129-5p im Vergleich zu den Kontrollgruppen gemessen, welche am stärksten 1 h nach PPS und einen Monat nach dem ersten spontanen Anfall war (Abbildung 25 B).

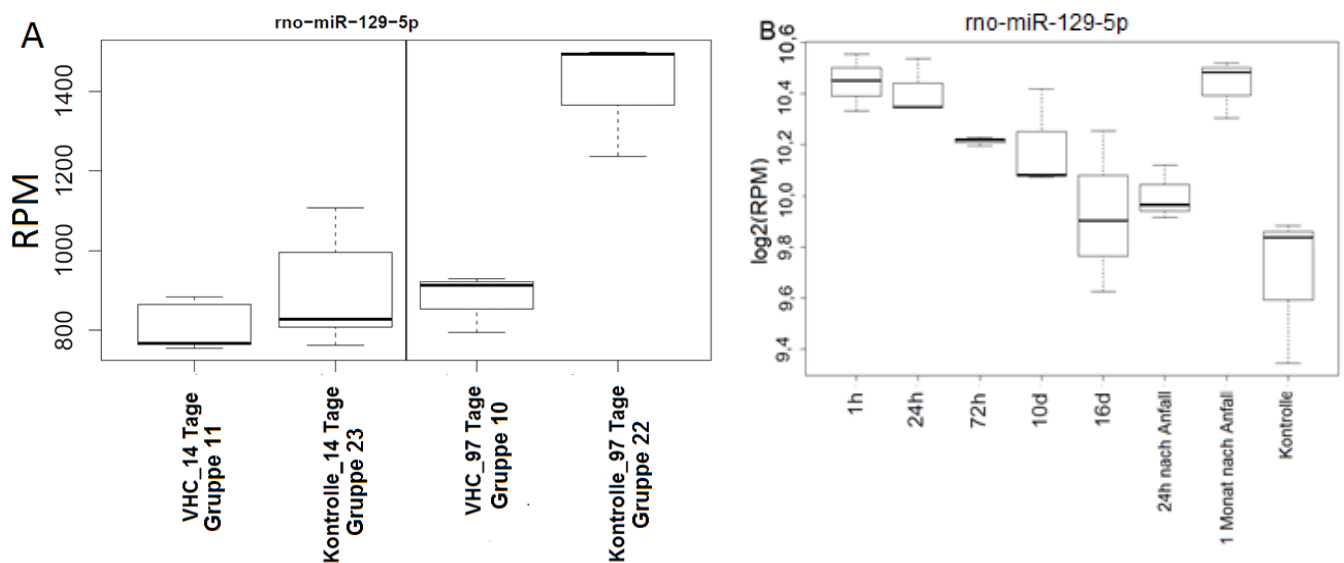


Abbildung 25 Expression der miRNA-129-5p

**A** Expression der miRNA-129-5p nach VHC-DBS. MiRNA-129-5p war in der Gruppe 22 (VHC-Kontrolle, 97d) verglichen mit der Gruppe 23 (VHC-Kontrolle, 14 Tage nach PPS) signifikant hochreguliert ( $p=0,00008$ ). Zwischen den VHC-DBSgruppen (Gruppe 10 und 11) bestand keine signifikante Regulation. Es war außerdem ein signifikanter Unterschied zwischen VHC-DBS (Gruppe 10) und VHC-Kontrollgruppe (Gruppe 22) 97 Tage nach PPS zu messen ( $p=0,0003$ ). **B** Expression der miRNA-129-5p während der Epileptogenese und bei manifester Epilepsie. Es bestand eine Hochregulation der miRNA-129-5p während der frühen Zeitpunkte der Epileptogenese, diese war 1 h

( $p=0,00085$ ) und 24 h ( $p=0,002$ ) nach der PPS und einen Monat ( $p=0,001$ ) nach dem ersten Anfall signifikant.

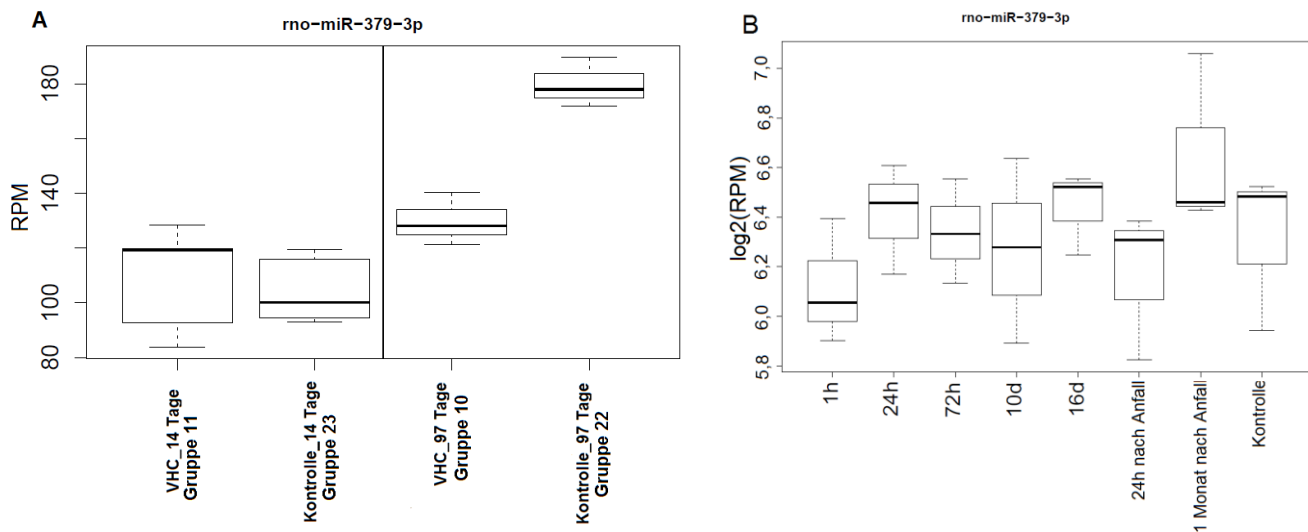


Abbildung 26 Expression der miRNA-379-3p

**A** Expression der miRNA-379-3p nach VHC-DBS. Die miRNA-379-3p war signifikant hochreguliert zwischen Gruppe 22 (VHC-Kontrolle 97 Tage nach der PPS) verglichen mit Gruppe 23 (VHC-Kontrolle 14 Tage nach PPS;  $p=0,00002$ ). Zwischen den VHC-DBSsgruppen (Gruppe 10 und 11) bestand keine signifikante Regulation. Der Unterschied zwischen der VHC-DBSsgruppe (Gruppe 10) und der VHC-Kontrollgruppe (Gruppe 22) nach 97 Tagen war ebenfalls signifikant ( $p=0,00334$ ). **B** Expression der miRNA-379-3p während der Epileptogenese und bei manifester Epilepsie. Die miRNA-379-3p war 1 h nach PPS leicht herunterreguliert. Es wurde keine signifikante Regulation gemessen.

MiRNA-379-3p war in der Kontrollgruppe nach 97 Tagen (Gruppe 22) verglichen mit der Kontrollgruppe nach 14 Tagen (Gruppe 23) signifikant hochreguliert (Abbildung 26 A), was sich im gleichen Modell ohne DBS allerdings nicht bestätigte (Abbildung 26 B).

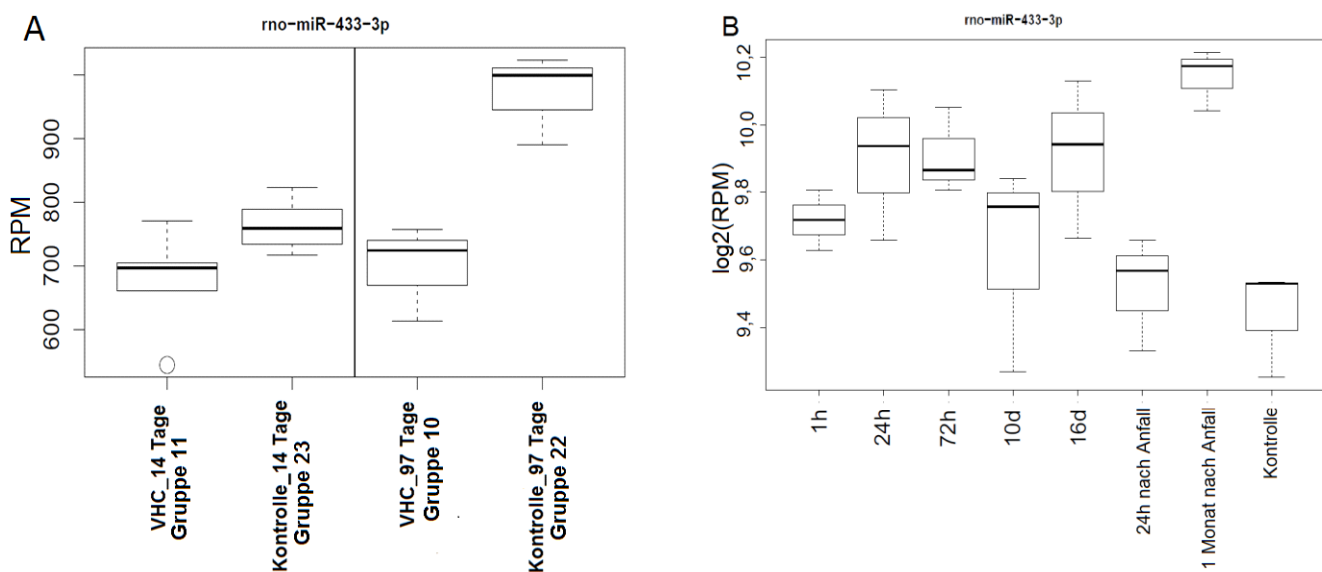


Abbildung 27 Expression der miRNA-433-3p

**A** Expression der miRNA-433-3p nach VHC-DBS. Die miRNA-433-3p war signifikant hochreguliert zwischen Gruppe 22 (VHC-Kontrolle 97 Tage nach der PPS) verglichen mit Gruppe 23 (VHC-Kontrolle 14 Tage nach PPS;  $p=0,003$ ). Zwischen den VHC-DBSgruppen (Gruppe 10 und 11) bestand keine signifikante Regulation. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen VHC-DBS (Gruppe 10) und VHC-Kontrollgruppe (Gruppe 22) 97 Tage nach PPS ( $p=0,0011$ ). **B** Expression der miRNA-433-3p während der Epileptogenese und bei manifester Epilepsie. Die miRNA-433-3p war während der Epileptogenese hochreguliert. 24 Stunden nach dem ersten Anfall ist die Expression etwa auf Kontrolllevel und 1 Monat nach dem ersten Anfall ist die Expression stark erhöht ( $p=0,003$ ).

miRNA-433-3p zeigte ebenfalls eine Hochregulation nach 97 Tagen nur in der Kontrollgruppe (Gruppe 23 gegen Gruppe 22) und nicht zwischen den VHC-DBS-Gruppen (Gruppe 10 und 11; A). Die Hochregulation der miRNA-433-3p war auch einen Monat nach dem ersten Anfall messbar. Auch während der Epileptogenese war die miRNA-433-3p hochreguliert (Abbildung 27 B).

Die miRNA-431 zeigt ebenfalls ein ähnliches Expressions-Muster nach VHC-DBS (Abbildung 28 A). Außerdem wurde eine Hochregulation besonders in der früher Phase der Epileptogenese und einen Monat nach dem ersten Anfall gemessen (Abbildung 28 B). Die Expression dieser miRNA war in den analysierten Hippokampi insgesamt vergleichsweise niedrig.

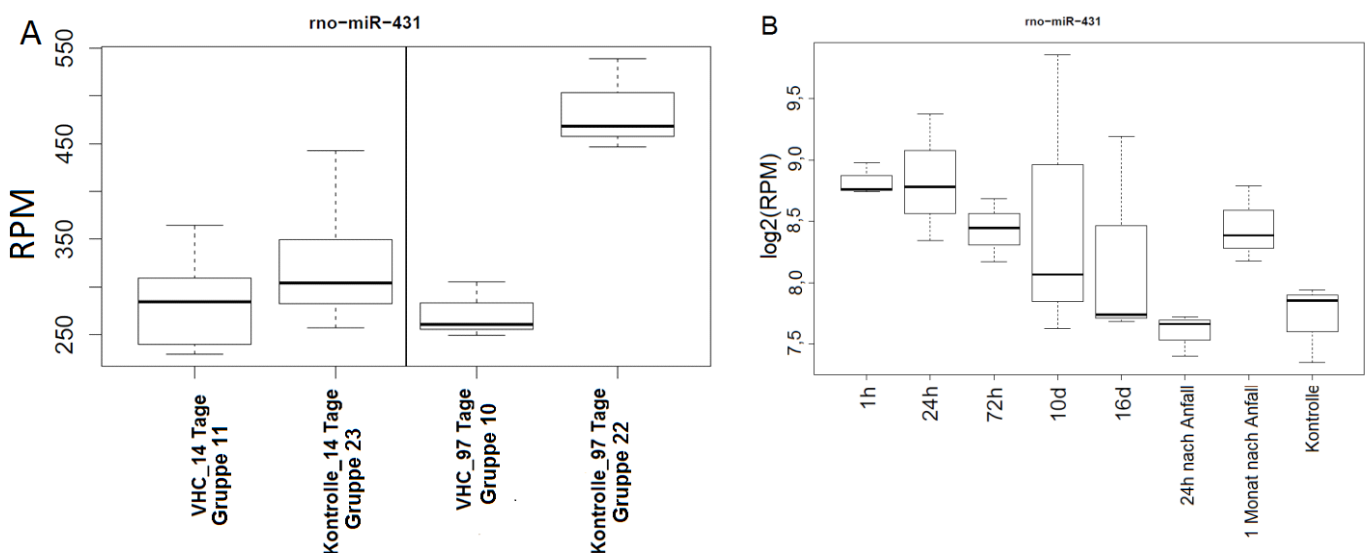


Abbildung 28 Expression der miRNA-431

**A** Expression der miRNA-431 nach VHC-DBS. Die miRNA-431 war signifikant hochreguliert zwischen Gruppe 22 (VHC-Kontrolle 97 Tage nach der PPS) verglichen mit Gruppe 23 (VHC-Kontrolle 14 Tage nach PPS;  $p=0,006$ ). Zwischen den VHC-DBSgruppen (Gruppe 10 und 11) bestand keine signifikante Regulation. Der Unterschied zwischen der VHC-DBSgruppe (Gruppe 10) und der VHC-Kontrollgruppe (Gruppe 22) nach 97 Tagen war ebenfalls signifikant ( $p=0,002$ ). **B** Expression der miRNA-431 während der Epileptogenese und bei manifester Epilepsie. Die miRNA-

431 ist hochreguliert in der frühen Phase der Epileptogenese. Die Regulation war allerdings nicht signifikant.

MiRNA-410-3p zeigte in der Kontrollgruppe nach 97 Tagen (Gruppe 22) eine signifikante Hochregulation verglichen mit der Kontrollgruppe nach 14 Tagen (Gruppe 23) (Abbildung 29 A), allerdings wurde auch eine Herunterregulation 24 h und 1 Monat nach dem ersten Anfall gemessen (Abbildung 29 B).

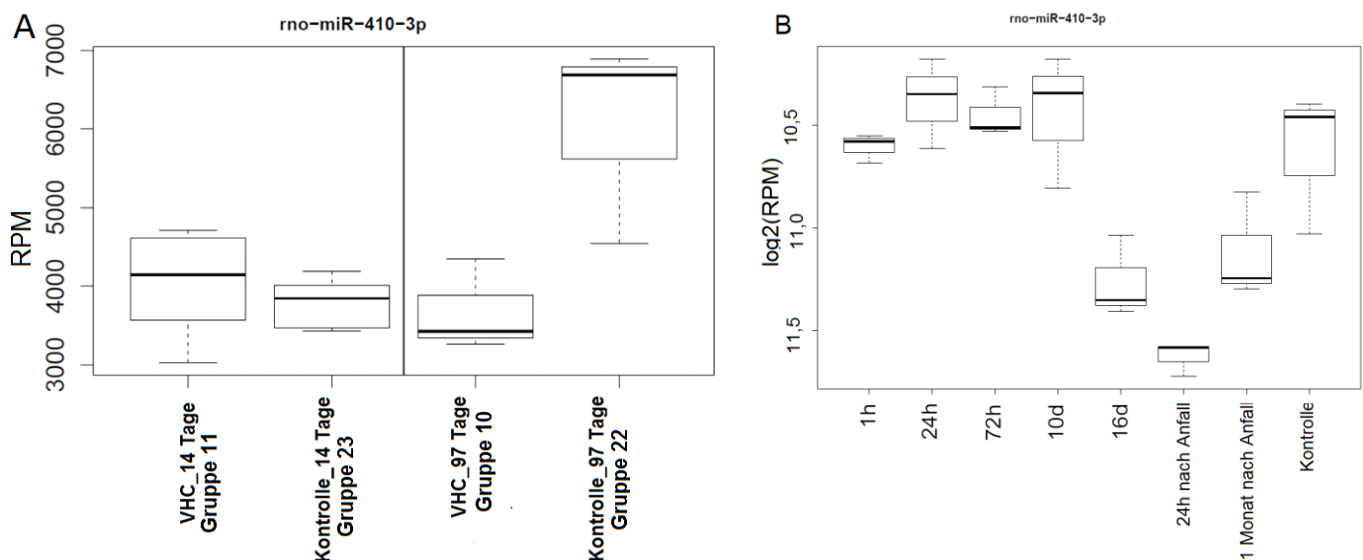


Abbildung 29 Expression der miRNA-410-3p

**A** Expression der miRNA-410-3p nach VHC-DBS. Die miRNA-410-3p war zwischen Gruppe 22 (VHC-Kontrolle 97 Tage nach der PPS) verglichen mit Gruppe 23 (VHC-Kontrolle 14 Tage nach PPS;  $p=0,003$ ) signifikant hochreguliert. Zwischen den VHC-DBSsgruppen (Gruppe 10 und 11) bestand keine signifikante Regulation. Der Unterschied zwischen der VHC-DBSsgruppe (Gruppe 10) und der VHC-Kontrollgruppe (Gruppe 22) nach 97 Tagen war ebenfalls signifikant ( $p=0,006$ ). **B** Expression der miRNA-410-3p während der Epileptogenese und bei manifester Epilepsie. Die miRNA-410-3p war 16 Tage nach PPS und 24 h ( $p=0,001$ ) sowie 1 Monat nach dem ersten Anfall herunterreguliert.

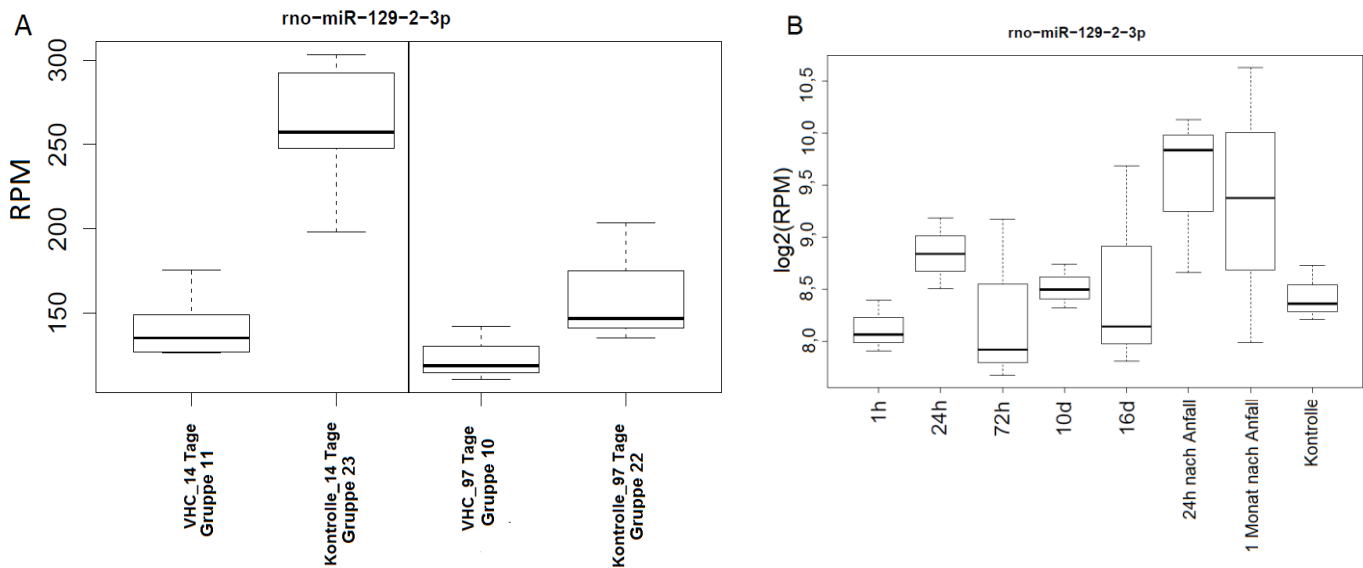
*Tabelle 6: Verschiedene Expressionsmuster der signifikant regulierten miRNAs und relatives Ausmaß der Regulation.*

<u>Signifikante Regulation nur zwischen der Gruppe 23 (VHC-Kontrolle 14d nach PPS) und der Gruppe 22 (VHC-Kontrolle 97d nach PPS)</u>	<u>Signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 11 (VHC-DBS) und der Gruppe 23 (VHC-Kontrolle) direkt nach DBS</u>	<u>Signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 10 (VHC-DBS) und der Gruppe 22 (VHC-Kontrolle) 97 Tage nach PPS</u>
Herunterregulierte miRNAs	Herunterregulierte miRNAs	Herunterregulierte miRNAs
miRNA-187-3p -54 %	rno-miRNA-129-2-3p -45 %	miRNA-132-3p -51 %
miRNA-129-2-3p -38 %	rno-miRNA-24-3p -27 %	miRNA-431 -44 %
miRNA-3085 -37 %	rno-let-7b-5p -20 %	miRNA-410-3p -39 %
miRNA-24-3p -30 %		miRNA-129-5p -38 %
miRNA-191a-5p -28 %	Hochregulierte miRNAs	miRNA-341 -37 %
miRNA-326-3p -27 %		miRNA-369-3p -33 %
miRNA-148b-3p -26 %	miRNA-181a-1-3p 28 %	miRNA-337-5p -31 %
miRNA-103-3p -17 %	let-7d-3p 27 %	miRNA-487b-3p -30 %
	let-7e-5p 19 %	miRNA-136-5p -30 %
Hochregulierte miRNAs	let-7d-5p 19 %	miRNA-323-3p -29 %
	let-7a-1-3p 18 %	miRNA-433-3p -28 %
miRNA-485-3p 129 %		miRNA-379-3p -28 %
miRNA-136-5p 122 %		miRNA-181a-1-3p -22 %
miRNA-379-3p 73 %		miRNA-431 -51 %
miRNA-1224 72 %		miRNA-410-3p -39 %
miRNA-132-3p 62 %		miRNA-129-5p -38 %
miRNA-181a-1-3p 62 %		miRNA-341 -37 %
miRNA-410-3p 59 %		
miRNA-129-5p 59 %		Hochregulierte miRNAs
miRNA-431 50 %		
Let-7d-3p 48 %		let-7a-5p 16 %
miRNA-150-5p 46 %		let-7f-5p 14 %
miRNA-487b-3p 34 %		
miRNA-27b-5p 32 %		
miRNA-433-3p 27 %		
miRNA-101a-3p 26 %		
Let-7c-3-3p 24 %		

Die Abbildungen 30 bis 37 zeigen die direkt nach der VHC-DBS signifikant unterschiedlich exprimierten miRNAs, welche in der zweiten Spalte von Tabelle 6 aufgeführt sind. Die Abbildung 30 B bis 37 B zeigt die Expression der gleichen miRNAs im selben Tiermodell während und nach der Epileptogenese (EpimiRNA-Projekt, unveröffentlichte Daten).

miRNA-129-2-3p zeigte keinen Unterschied zwischen den VHC-stimulierten Ratten der verschiedenen Zeitpunkte (Gruppe 10 und Gruppe 11). In den Kontrollratten war die Expression nach 97 Tagen signifikant niedriger (Gruppe 22) als nach 14 Tagen (Gruppe 23) und damit nur leicht höher als in den VHC-stimulierten Ratten (Gruppe 10) Abbildung

30 A). Die Daten in Abbildung 30 B zeigen eine Hochregulation 24 h nach der PPS und 24 h sowie 1 Monat nach dem ersten Anfall.



**A** Expression der *miRNA-129-2-3p* nach VHC-DBS. Es bestand ein signifikanter Unterschied der Expression von *miRNA-129-2-3p* zwischen der Gruppe 23 (VHC-Kontrolle 14 Tage nach PPS) und Gruppe 22 (VHC-Kontrolle 97 Tage nach PPS;  $p=0,003$ ). Außerdem war eine signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 23 (VHC-Kontrolle 14 Tage nach PPS) und der Gruppe 11 (VHC-DBS, 14Tage nach PPS) vorhanden ( $p=0,0001$ ). **B** Expression der *miRNA-129-2-3p* während der Epileptogenese und bei manifester Epilepsie. Die *miRNA-129-2-3p* war 24 h und einen Monat nach dem ersten Anfall hochreguliert. Der Unterschied zur Kontrollgruppe war nicht signifikant.

*miRNA-24-3p* war ebenfalls in den VHC-stimulierten Ratten direkt nach der DBS (Gruppe 11) signifikant niedriger exprimiert als in den Kontrollratten (Gruppe 23). Die Expression in den Kontrollratten war nach 97 Tagen (Gruppe 22) signifikant niedriger als nach 14 Tagen (Gruppe 23) und niedriger als in den VHC-stimulierten Ratten zu diesem Zeitpunkt (Gruppe 10). In Abbildung 31 B ist eine Hochregulation der *miRNA-24-3p* 24 h und einen Monat nach dem ersten Anfall zu sehen.

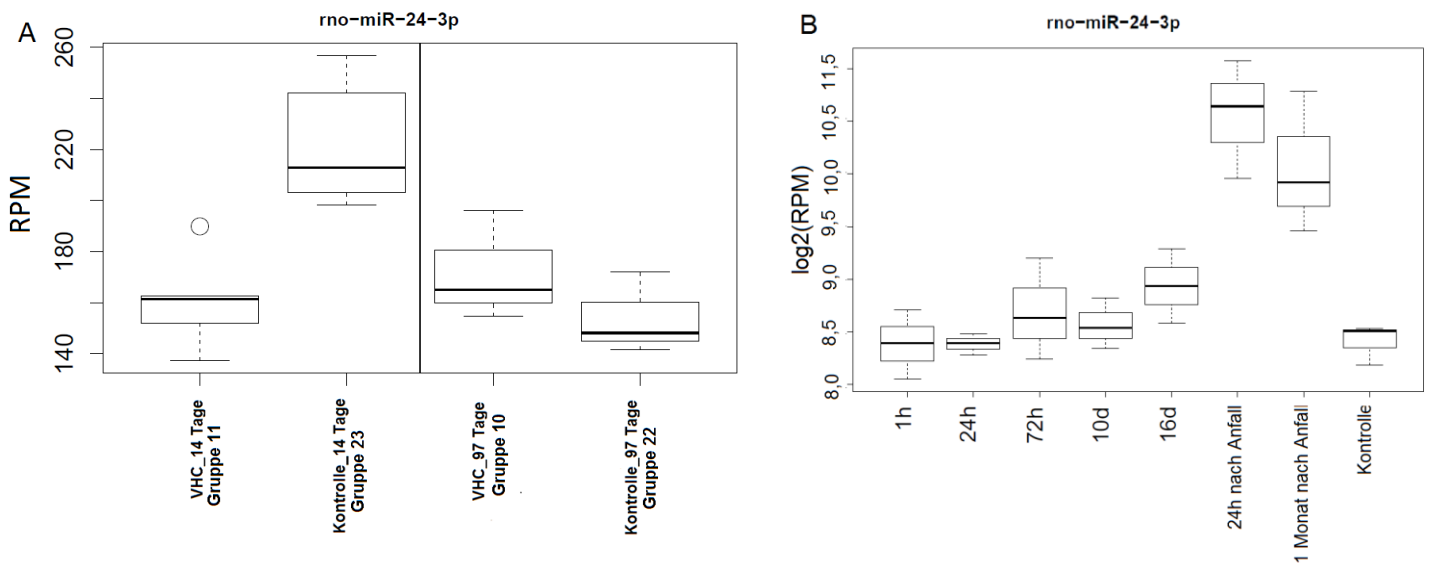


Abbildung 30 Expression der miRNA-24-3p

**A** Expression der miRNA-24-3p nach VHC-DBS. Es bestand ein signifikanter Unterschied der Expression von miRNA-24-3p zwischen der Gruppe 23 (VHC-Kontrolle 14 Tage nach PPS) und der Gruppe 11 (VHC-DBS, 14 Tage nach PPS;  $p=0,002$ ). Außerdem war ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 23 (VHC-Kontrolle 14 Tage nach PPS) und Gruppe 22 (VHC-Kontrolle 97 Tage nach PPS;  $p=0,0027$ ). **B** Expression der miRNA-24-3p während der Epileptogenese und bei manifester Epilepsie. Die miRNA-24-3p war 24 Stunden ( $p=0,0006$ ) und einen Monat ( $p=0,04$ ) nach dem ersten Anfall hochreguliert.

Let-7b-5p war ebenfalls nach der VHC-DBS (Gruppe 11) signifikant niedriger exprimiert als in den Kontroll-Hippokampi (Gruppe 23). Nach 97 Tagen war die Expression in den Kontroll-Hippokampi (Gruppe 22) signifikant niedriger als in den VHC-stimulierten Ratten (Gruppe 10). Die Daten aus Abbildung 32 B zeigen eine herunterregulierte Expression im Verlaufe der Epileptogenese und 24 h nach dem ersten Anfall.

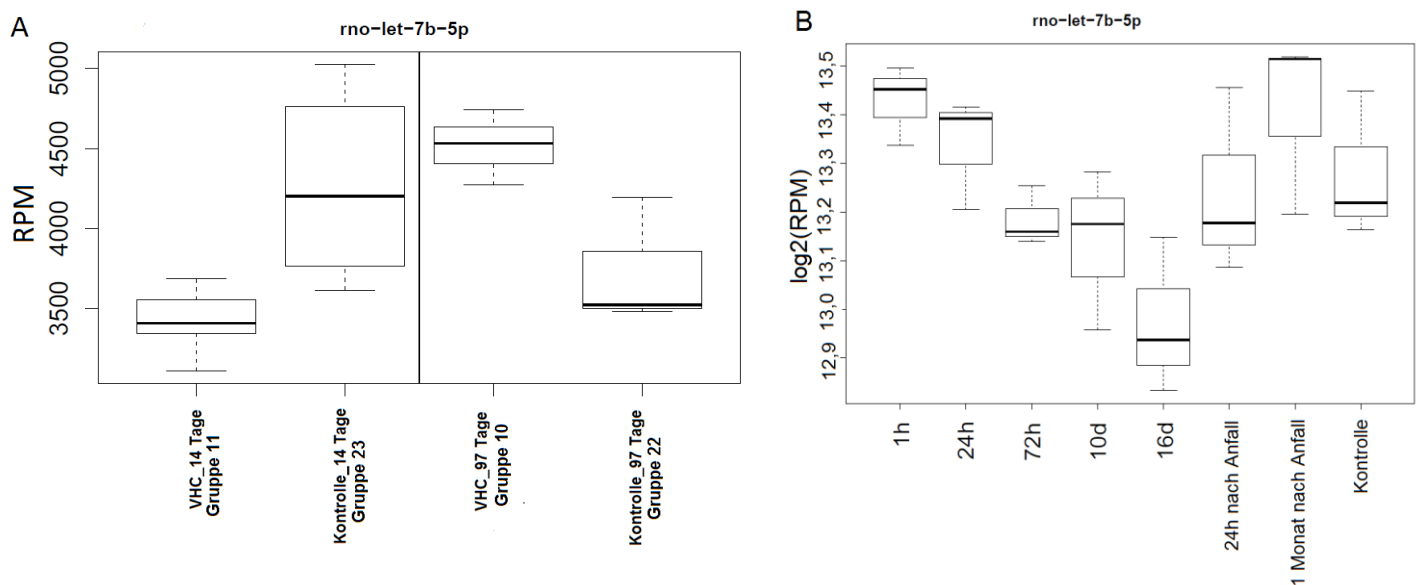


Abbildung 31 Expression der miRNA-let-7d-5p



**A** Expression der *let-7b-5p* nach VHC-DBS. Es bestand ein signifikanter Unterschied der Expression von *let-7b-5p* zwischen der Gruppe 23 (VHC-Kontrolle 14 Tage nach PPS) und der Gruppe 11 (VHC-DBS, 14 Tage nach PPS;  $p=0,02$ ). Außerdem war ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 11 (VHC-DBS, 14 Tage nach PPS) und der Gruppe 10 (VHC-DBS, 97 Tage nach PPS) vorhanden ( $p=0,01$ ). **B** Expression der *let-7b-5p* während der Epileptogenese und bei manifester Epilepsie. Die *let-7b-5p* war 1 und 24 Stunden nach PPS sowie 1 Monat nach dem ersten Anfall hochreguliert. Außerdem wurde eine Herunterregulation der *let-7b-5p* 16 Tage nach PPS gemessen. Die Unterschiede zur Kontrollgruppe waren nicht signifikant.

miRNA-181a-1-3p war nach 14 Tagen in den VHC-stimulierten Ratten (Gruppe 11) signifikant höher exprimiert als in den Kontrollratten (Gruppe 23). Nach 97 Tagen war die Expression in den VHC-stimulierten Ratten (Gruppe 10) unverändert und in den Kontrollratten (Gruppe 22) erhöht und damit höher als die der VHC-stimulierten Ratten (Gruppe 10) Abbildung 33 A). Abbildung 33 B zeigt eine verringerte Expression 16 Tage nach PPS und 24 h sowie 1 Monat nach dem ersten Anfall. Die Expression in den zusätzlichen Kontrollgruppen (Gruppe 24 und 25), besonders in den Ratten, die trotz PPS keine spontanen Anfälle hatten, war deutlich höher als in allen anderen Gruppen.

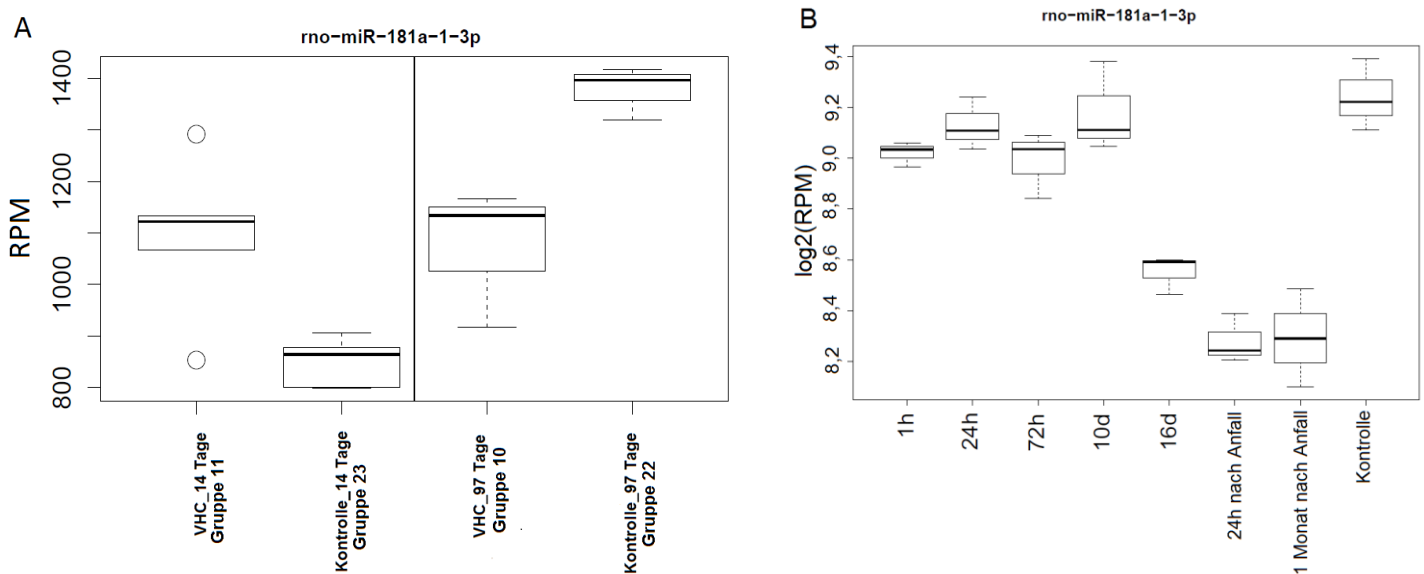


Abbildung 32 Expression der miRNA-181a-1-3p

**A** Expression der miRNA-181a-1-3p nach VHC-DBS. Die Abbildung zeigt einen signifikanten Unterschied der Expression von miRNA-181a-1-3p zwischen der Gruppe 23 (VHC-Kontrolle 14 Tage nach PPS) und der Gruppe 11 (VHC-DBS, 14 Tage nach PPS;  $p=0,01$ ). Außerdem war ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 23 (VHC-Kontrolle 14 Tage nach PPS) und Gruppe 22 (VHC-Kontrolle 97 Tage nach PPS) zu messen ( $p=0,00006$ ). Nach 97 Tagen bestand ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der VHC Gruppe (Gruppe 10 gegen Gruppe 22;  $p=0,019435$ ). **B** Expression der miRNA-181a-1-3p während der Epileptogenese und bei manifester Epilepsie. Die miRNA-181a-1-3p war 16 Tage nach PPS ( $p=0,005$ ) und 24 h ( $p=0,00000002$ ) sowie einen Monat ( $p=0,0004$ ) nach dem ersten Anfall herunterreguliert.

Let-7d-3p war ebenfalls direkt nach der VHC-DBS signifikant stärker exprimiert (Gruppe 11) als in der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt (Gruppe 23). Nach 97 Tagen war die



Expression in beiden Gruppen (Gruppe 10 und 22) erhöht und etwa gleich stark (Abbildung 34 A). Abbildung 34 B zeigt eine Hochregulation 24 h und 1 Monat nach dem ersten Anfall. Auch in den zusätzlichen Kontrollgruppen, die keine PPS erhalten hatten (Gruppe 24) oder trotz PPS keine spontanen Anfälle entwickelten (Gruppe 25), war die Expression erhöht.

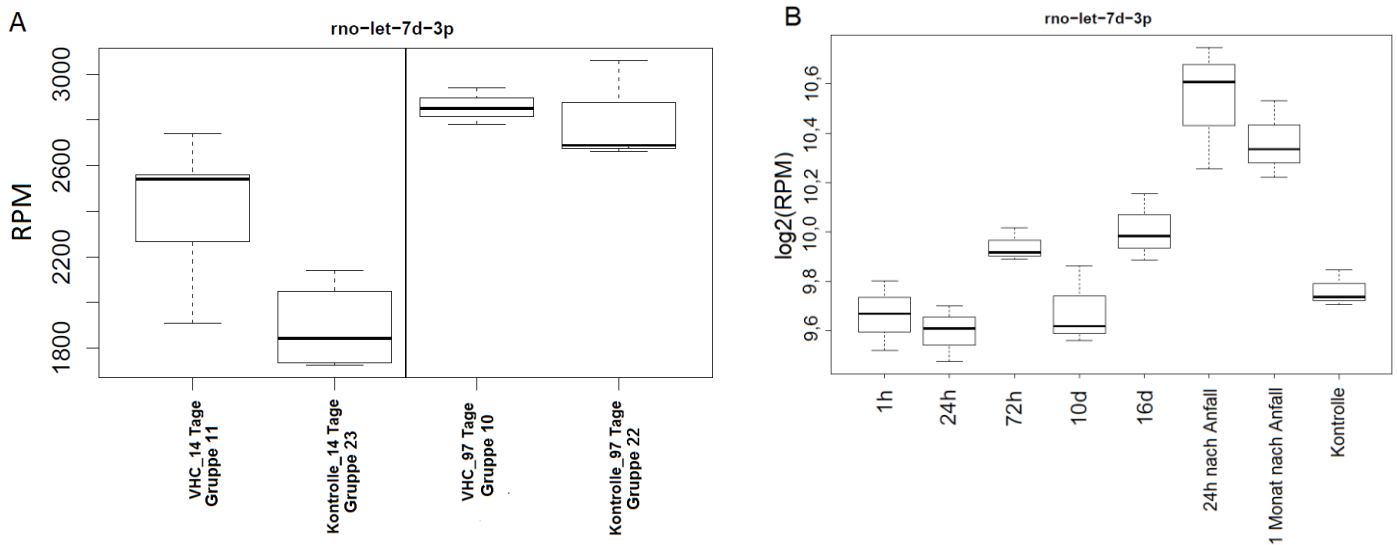


Abbildung 33 Expression der *let-7d-3p*

**A** Expression der *let-7d-3p* nach VHC-DBS. Es bestand ein signifikanter Unterschied der Expression von *let-7d-3p* zwischen der Gruppe 23 (VHC-Kontrolle 14 Tage nach PPS) und der Gruppe 11 (VHC-DBS, 14 Tage nach PPS;  $p=0,01$ ). Außerdem war ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 23 (VHC-Kontrolle, 14 Tage nach PPS) und der Gruppe 22 (VHC-Kontrolle, 97 Tage nach PPS) vorhanden ( $p=0,0002$ ). **B** Expression der *let-7d-3p* während der Epileptogenese und bei manifester Epilepsie. Die *let-7d-3p* war 24 h nach dem ersten Anfall signifikant hochreguliert ( $p=0,007$ ).

Let-7e-5p war ebenfalls direkt nach der VHC-DBS (Gruppe 11) höher exprimiert als in der Kontrollgruppe (Gruppe 23). Nach 97 Tagen war die Expression in den VHC-stimulierten Ratten (Gruppe 10) höher als nach 14 Tagen (Gruppe 11), ebenso war die Expression in der Kontrollgruppe nach 97 Tagen (Gruppe 22) höher als nach 14 Tagen (Gruppe 23), jedoch niedriger als bei den VHC-stimulierten Ratten (Gruppe 10 Abbildung 35 A). Die Daten während der Epileptogenese zeigen eine etwas niedrigere Expression nach der PPS, die 24 h nach dem ersten Anfall etwa auf Kontrolllevel anstieg und 1 Monat nach dem ersten Anfall etwas erhöht war (Abbildung 35 B).

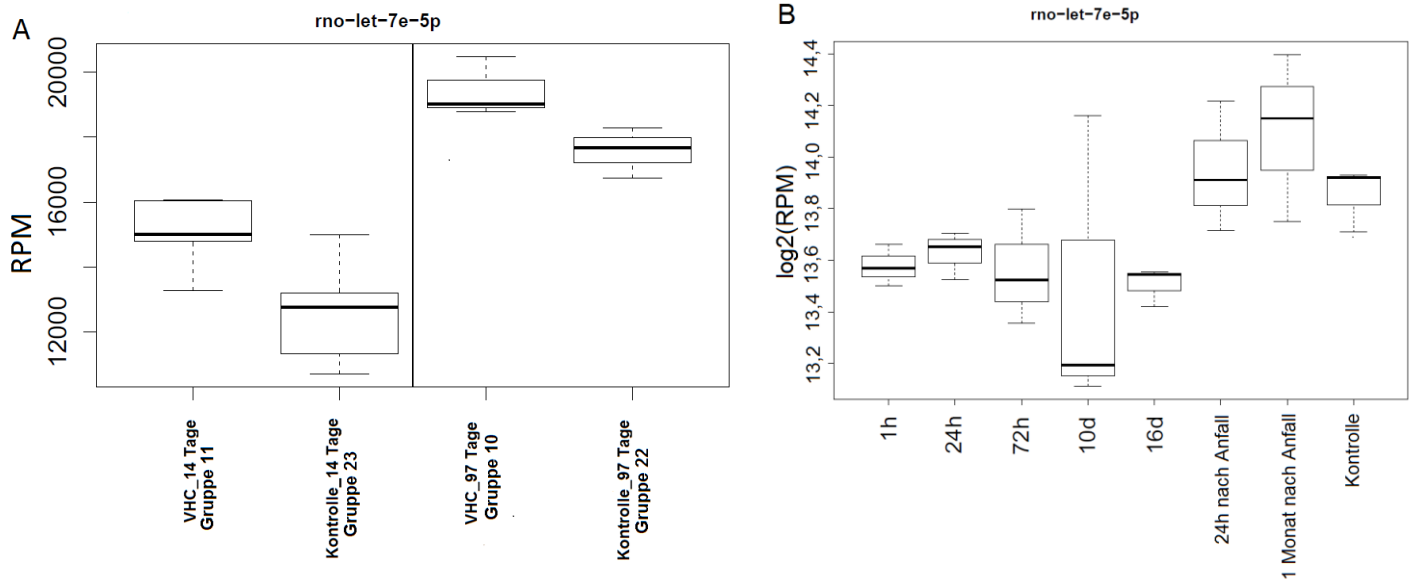


Abbildung 34 Expression der *let-7e-5p*

**A** Expression der *let-7e-5p* nach VHC-DBS. Es bestand ein signifikanter Unterschied der Expression von *let-7e-5p* zwischen der Gruppe 23 (VHC-Kontrolle, 14 Tage nach PPS) und der Gruppe 22 (VHC-Kontrolle, 97 Tage nach PPS;  $p=0,03$ ). Außerdem war eine signifikanter Unterschied zwischen der Gruppen 23 (VHC-Kontrolle, 14 Tage nach PPS) und der Gruppe 22 (VHC-Kontrolle, 97 Tage nach PPS;  $p=0,0004$ ) sowie zwischen der Gruppe 11 (VHC-DBS, 14 Tage nach PPS) und der Gruppe 10 (VHC-DBS, 97 Tage nach PPS;  $p=0,001$ ) vorhanden. **B** Expression der *miRNA-129-2-3p* während der Epileptogenese und bei manifester Epilepsie. Die *let-7e-5p* war in der Epileptogenesephase leicht herunterreguliert. Es waren allerdings keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe vorhanden.

*Let-7d-5p* war direkt nach der VHC-DBS signifikant höher exprimiert als in der Kontrollgruppe und nach 97 Tagen in der Kontrollgruppe etwa auf dem gleichen Level exprimiert wie nach 14 Tagen. Die Expression in der VHC-DBS-Gruppe war nach 97 Tagen nur leicht höher als in der Kontrollgruppe. Während der frühen Epileptogenese war die Expression etwas höher als in der Kontrollgruppe, nach 16 Tagen hatte die Expression allerdings abgenommen und stieg dann 1 Monat nach dem ersten Anfall wieder an.

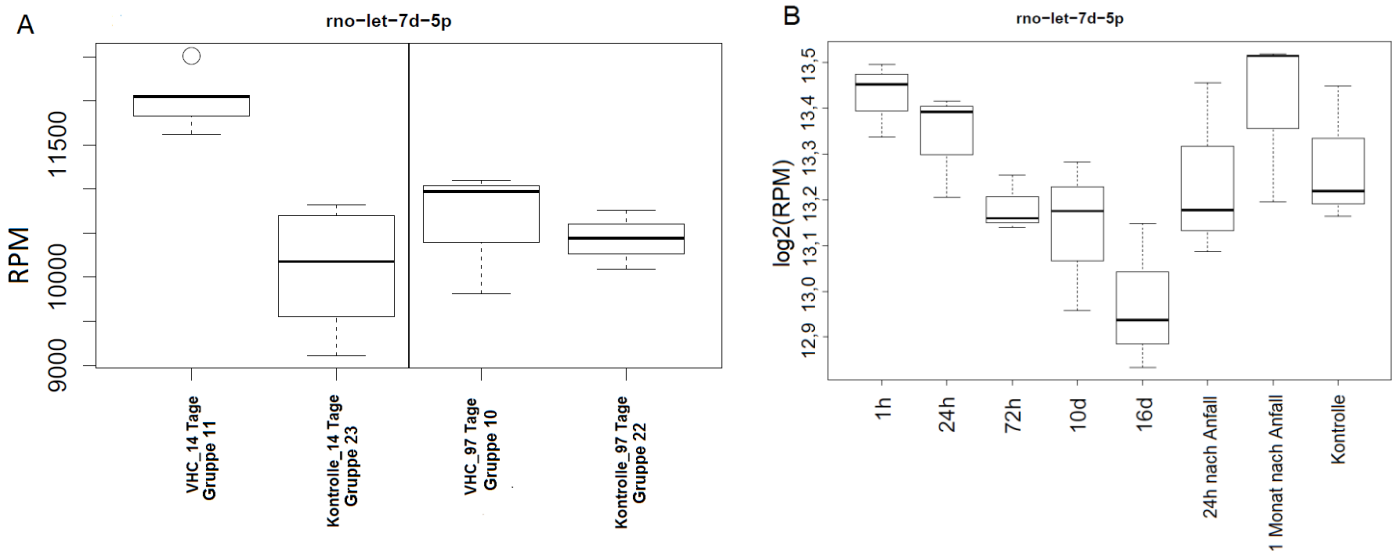


Abbildung 35 Expression der let-7d-5p

**A** Expression der let-7d-5p nach VHC-DBS. Es bestand ein signifikanter Unterschied der Expression von let-7d-5p zwischen der Gruppe 23 (VHC-Kontrolle, 14 Tage nach PPS) und der Gruppe 22 (VHC-Kontrolle, 97 Tage nach PPS;  $p = 0,0003$ ). Außerdem war ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 11 (VHC-DBS, 14 Tage nach PPS) und der Gruppe 10 (VHC-DBS, 97 Tage nach PPS) vorhanden ( $p = 0,02$ ). **B** Expression der let-7d-5p während der Epileptogenese und bei manifester Epilepsie. Es wurde eine geringe Hochregulation der let-7d-5p 1 und 24 h nach PPS und eine Herunterregulation 16 Tage nach PPS gemessen. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe wurde nicht gemessen.

Let-7a-1-3p war ebenfalls nach 14 Tagen in der VHC-DBSsgruppe höher exprimiert als in der Kontrollgruppe. Nach 97 Tagen war die Expression in beiden Gruppen angestiegen und in der VHC-Gruppe etwas höher als in der Kontrollgruppe. Während der Epileptogenese und in der chronischen Epilepsiephase zeigte sich eine erhöhte Expression der let-7a-1-3p.

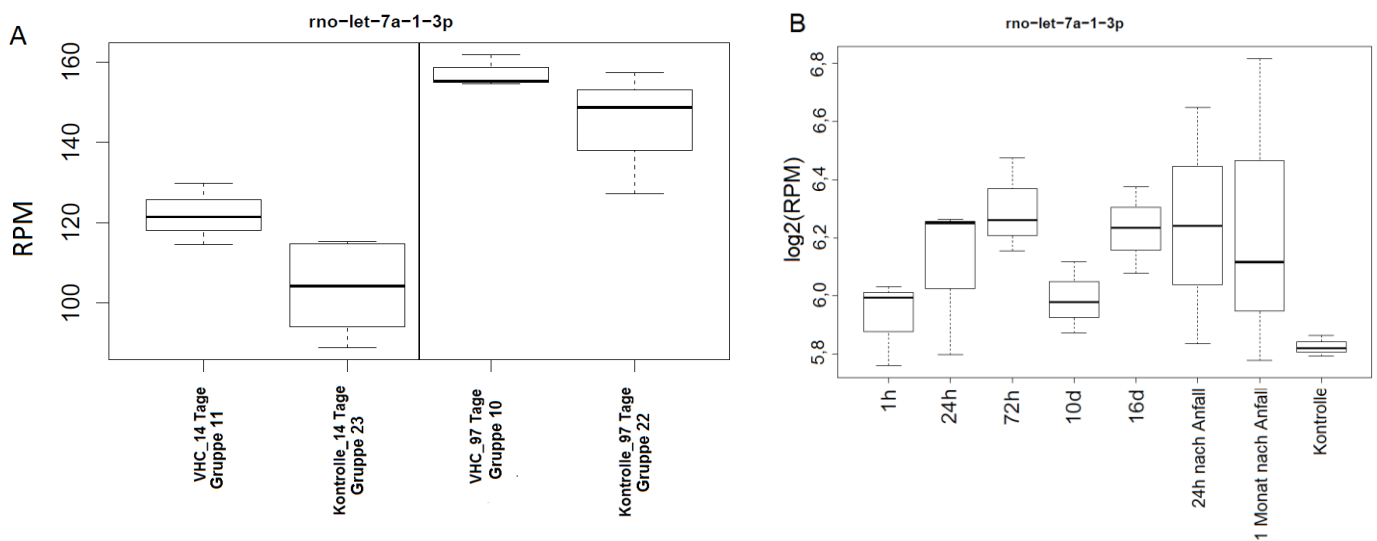


Abbildung 36 Expression der let-7a-1-3p

**A** Expression der *let-7a-1-3p* nach VHC-DBS. Es bestand ein signifikanter Unterschied der Expression von *let-7a-1-3p* zwischen der Gruppe 23 (VHC-Kontrolle, 14 Tage nach PPS) und der Gruppe 22 (VHC-Kontrolle, 97 Tage nach PPS;  $p=0,04$ ). Außerdem war ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 11 (VHC-DBS, 14 Tage nach PPS) und der Gruppe 10 (VHC-DBS, 97 Tage nach PPS;  $p=0,002$ ) sowie zwischen den Gruppen 23 (VHC-Kontrolle, 14 Tage nach PPS) und 22 (VHC-Kontrolle, 97 Tage nach PPS;  $p=0,0004$ ) vorhanden. **B** Expression der *let-7a-1-3p* während der Epileptogenese und bei manifester Epilepsie. Es wurde eine geringe Hochregulation der *let-7a-1-3p* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der PPS gemessen, ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe wurde nicht gemessen.

#### 4.6. MikroRNA-Target-Interaktion

Die MTIs der miRNAs, die als relevant für die beschriebenen Fragestellungen identifiziert wurden, sind in den Abbildung 38, 39 und 40 dargestellt. Dazu gehören solche, die direkt nach der VHC-DBS signifikant reguliert waren (Abbildung 38 und Abbildung 40) und daher einen direkten Effekt der VHC-DBS darstellen können, und solche die nach der Epileptogenese reguliert waren, und in der VHC-stimulierten Gruppe keine Regulation aufwiesen (Abbildung 38).

Spezies in der eine MTI vorhergesagt wurde

- Mensch
- Mensch & Maus
- Mensch, Maus & Ratte
- Mensch & Ratte
- Maus & Ratte
- Ratte

mRNA targets

- keine Transkriptionsfaktoren
- Transkriptionsfaktoren

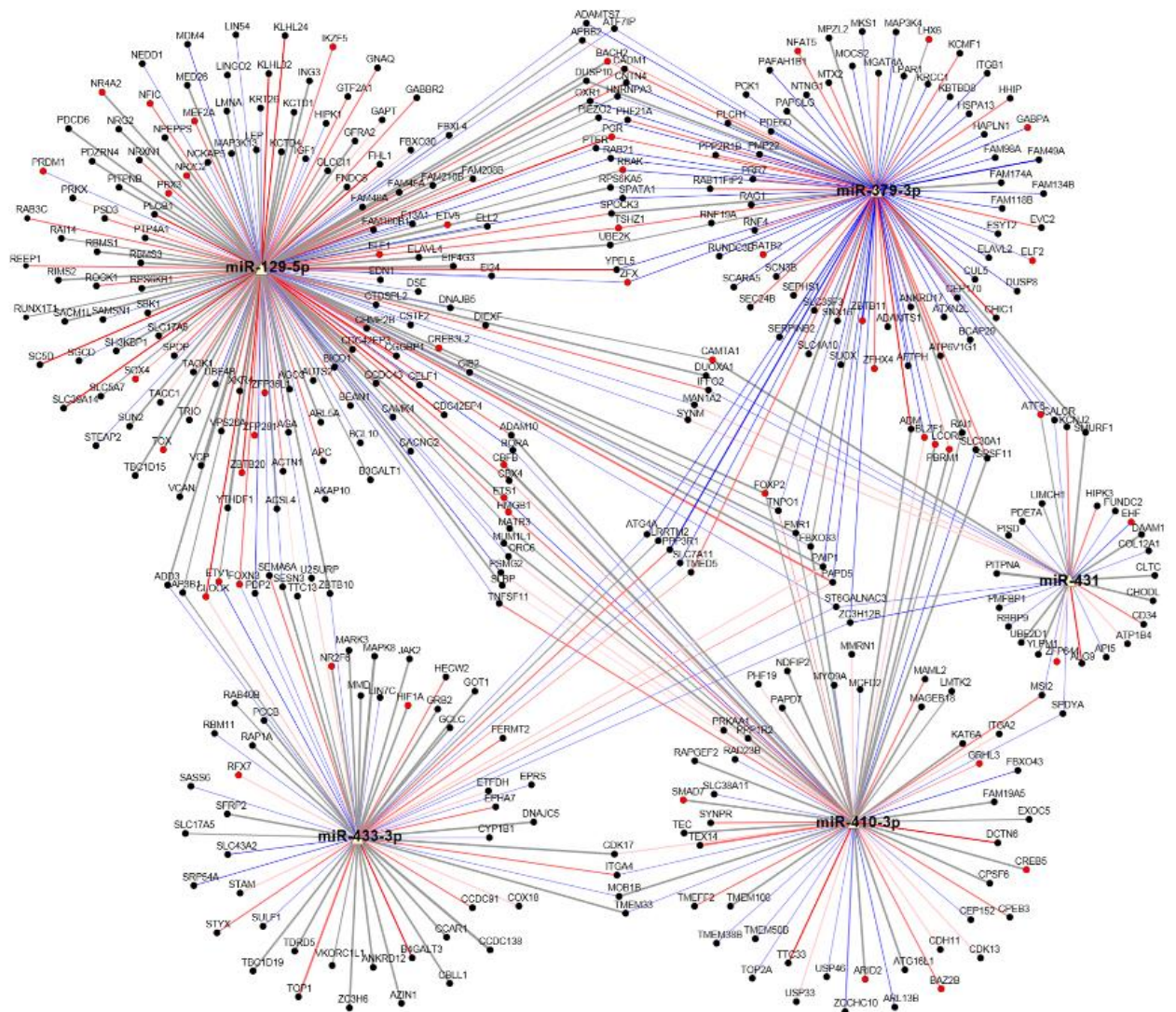


Abbildung 37 MTI mit einem *hsa\_Pscore* und *rno\_Pscore* von  $>0,55$  für die Interaktion mit mindestens einer der 5 miRNAs, die als relevant für den Effekt der VHC-DBS auf die Epileptogenese befunden wurden. Die Farbe der Verbindungslinien gibt an in welcher Spezies die Vorhersage gegeben ist. Die Farbe der Kreise gibt an ob es sich um einen Transkriptionsfaktor handelt (rot) oder nicht (schwarz).

Die Ziel-Analyse der 5 miRNAs, deren Hochregulation durch VHC-DBS unterdrückt wurde (Abbildung 24 O), ist in Abbildung 37 dargestellt. Die Abbildung zeigt die in der Kontrollgruppe regulierten miRNAs und alle Ziele, die einen *hsa\_Pscore* und *rno\_Pscore* von



>0,55 haben. Für diese Ziele sind weitere Interaktionen dargestellt, welche einen PScore von >0,1 haben, wobei die Stärke der Linien mit dem PScore korreliert. Es sind 457 Interaktionen dargestellt. Die Farbe der Linien gibt an, in welcher Spezies die Interaktion vorhergesagt wurde.

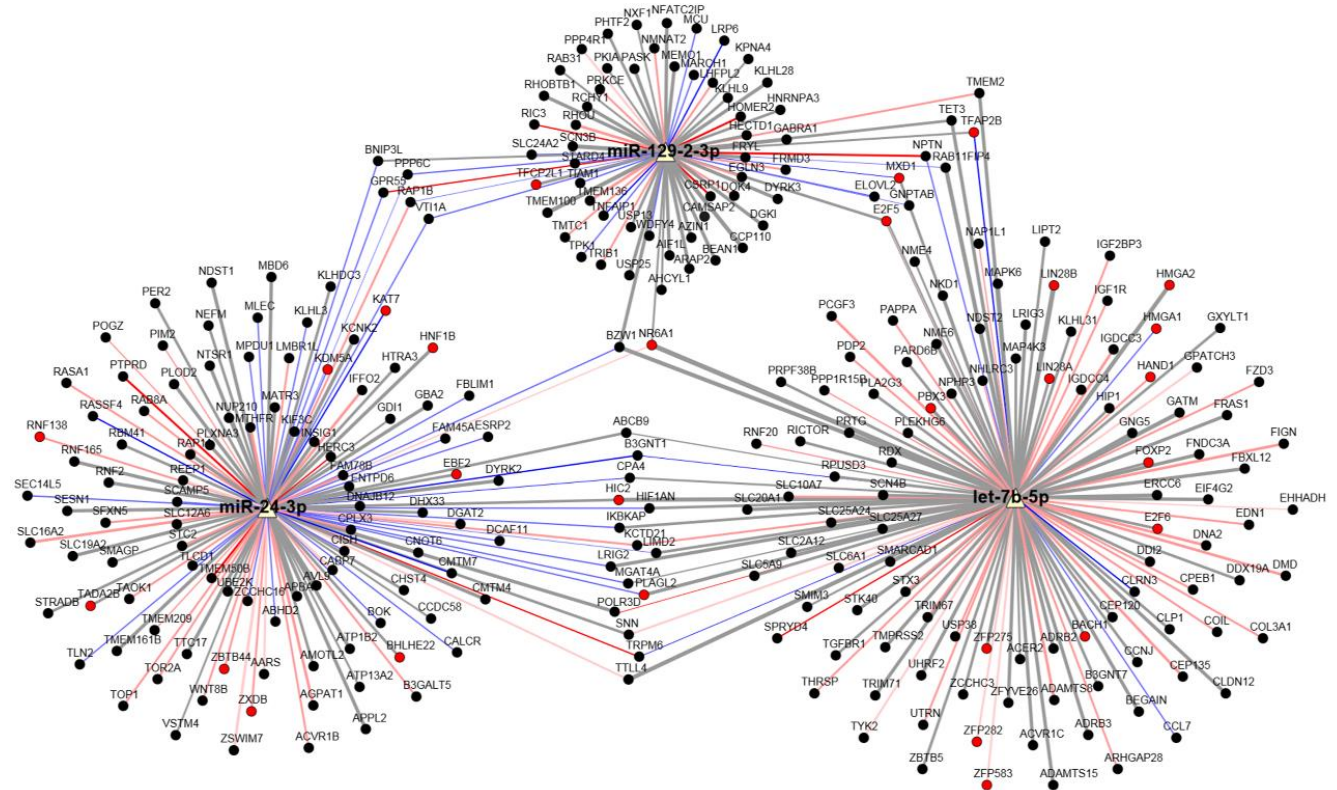


Abbildung 38 MTI mit einem *hsa\_Pscore* und *rno\_Pscore* von >0,45 für die Interaktion mit mindestens einer der 3 miRNAs, die direkt nach der VHC-DBS signifikant herunterreguliert waren.

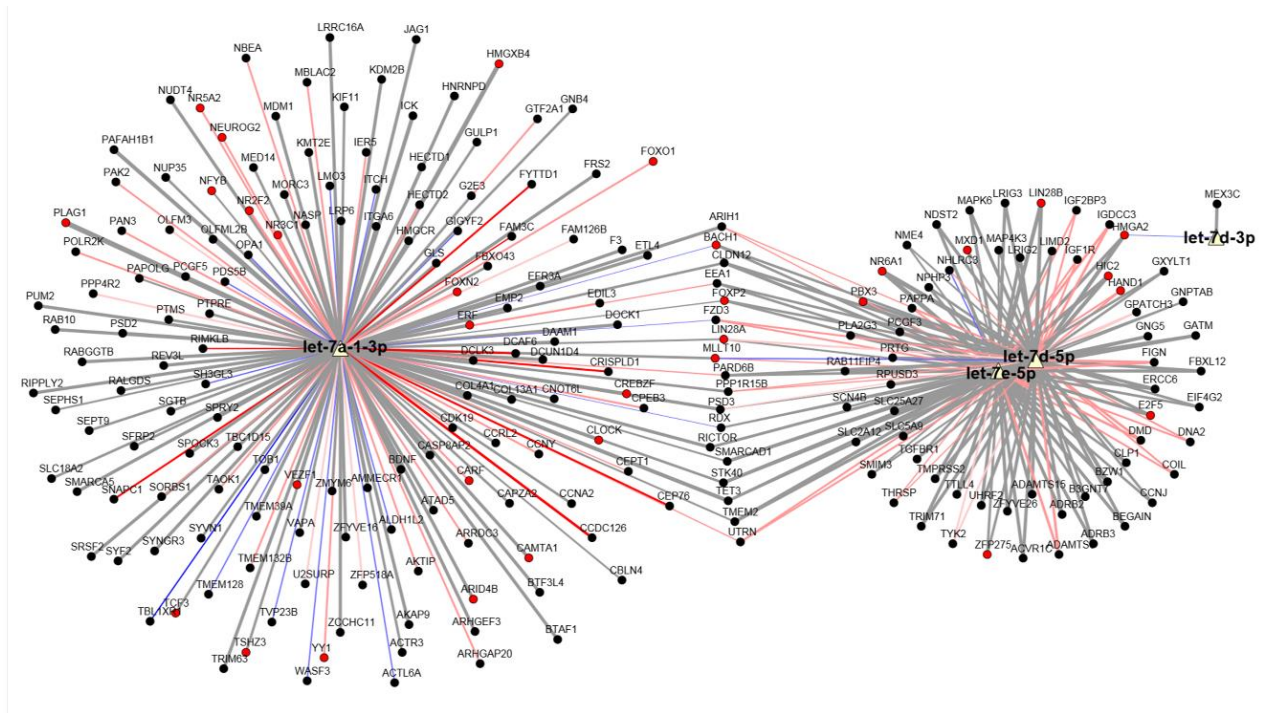


Abbildung 39 MTI mit einem *hsa\_Pscore* und *rno\_Pscore* von  $>0,5$  für die Interaktion mit mindestens einer der 5 miRNAs, die direkt nach der VHC-DBS signifikant hochreguliert waren.

Abbildung 39 zeigt die vorhergesagten Interaktionen der drei direkt nach der VHC-DBS signifikant herunterregulierten miRNAs. Es sind 285 MTI dargestellt, die die Kriterien, welche im Absatz 3.6.2 beschrieben sind erfüllen. Abbildung 40 zeigt die Interaktionen der fünf zum gleichen Zeitpunkt hochregulierten miRNAs. Es sind 506 Interaktionen dargestellt. Die miRNA-181a-1-3p hat keine Interaktionen mit einem *hsa\_* und *rno\_Pscore* von  $>0,5$  und ist deshalb nicht dargestellt.

#### 4.7. Validierung potentieller Targets der miRNA-433-3p

Es gab keine Targets der miRNA-433-3p deren Interaktion mit starker Evidenz in Ratten validiert wurde. Sieben mRNAs sind eine Interaktion mit miRNA-433-3p im Menschen mit starker Evidenz nachgewiesen worden (Amato et al., 2013; Gotanda et al., 2013; Kim et al., 2013; Li et al., 2013b; Lin et al., 2013; Luo et al., 2009; Wang et al., 2008, 2015). Davon hatte eine einen positiven *Pscore*, also eine Vorhersage aufgrund von Sequenz-Komplementarität in Ratten. Diese mRNA ist die des growth factor receptor bound 2 (GRB2). Antizyme inhibitor 1 (AZIN1) hatte ebenfalls einen positiven *Pscore* in Ratten und außerdem eine starke Evidenz für eine Interaktion nachgewiesen in Mäusen. Außerdem hat miRNA-433-3p ein Ziel mit starker Evidenz, welches ebenfalls einen evidenzbasierten MTI für die Interaktion mit miRNA-487b-3p hat. Die miRNA-487b-3p hat ein ähnliches Expressionsmuster wie die miRNA-433-3p, ist aber in der

Clusteranalyse nicht gezeigt, da sie einen FDR von  $>0,05$  in der ANOVA hat. Dieses Ziel-Gen ist das Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS). Die mRNA mit dem höchsten kombinierten Pscore (2,37) für miRNA-433-3p, also mit der größten Wahrscheinlichkeit einer Interaktion ermittelt anhand von vorhersagenden Datenbanken, war MAPK8. Die Interaktions-Scores der MIT der 4 untersuchten mRNAs mit der miRNA-433-3p sind in Tabelle 7 dargestellt.

*Tabelle 7: MIT-Analyse der Interaktionen von miRNA-433-3p und den 4 untersuchten mRNAs (AZIN1, GRB2, KRAS, MAPK8)*

MTI	h s a _ P S c o r e	mm u _ P S c o r e	rno _ P S c o r e	Co m b i n e d P s c o r e	hsa _ Ev T y p	mm u _ E v T y p	rno _ Ev T y p	hs a _ c n t	mm u _ c n t	rno _ c n t	hsa _ V S c o r e	mm u _ V _ S c o r e	rno _ V _ S c o r e	hsa _ F _ S c o r e	mmu _ F _ S c o r e	rno _ F _ S c o r e
miRNA-433-3p_AZIN1	0,45	0,74	0,74	1,95		Strong	-	-	1	-	-	0,5	-	0,46	1,25	0,75
miRNA-433-3p_GRB2	0,59	0,61	0,61	1,82	Strong	-	-	1	-	-	0,5	-	-	1,09	0,61	0,61
miRNA-433-3p_KRAS	-	-	-	-	Strong	-	-	1	-	-	0,5	-	-	0,5	-	-
miRNA-487b-3p_KRAS	-	-	-	-	Strong	-	-	1	-	-	0,5	-	-	0,5	-	-
miRNA-433-3p_MAPK8	0,79	0,79	0,79	2,37	Weak	-	-	1	-	-	0,5	-	-	1,29	0,79	0,79

Die Validierung der potentiellen Targets von miRNA-433-3p zeigte eine Hochregulation von GRB2, AZIN1, MAPK8 und KRAS in den VHC-stimulierten Ratten verglichen mit den Kontrollratten, die keine DBS erhalten hatten und eine höhere miRNA-433-3p Expression aufwiesen.



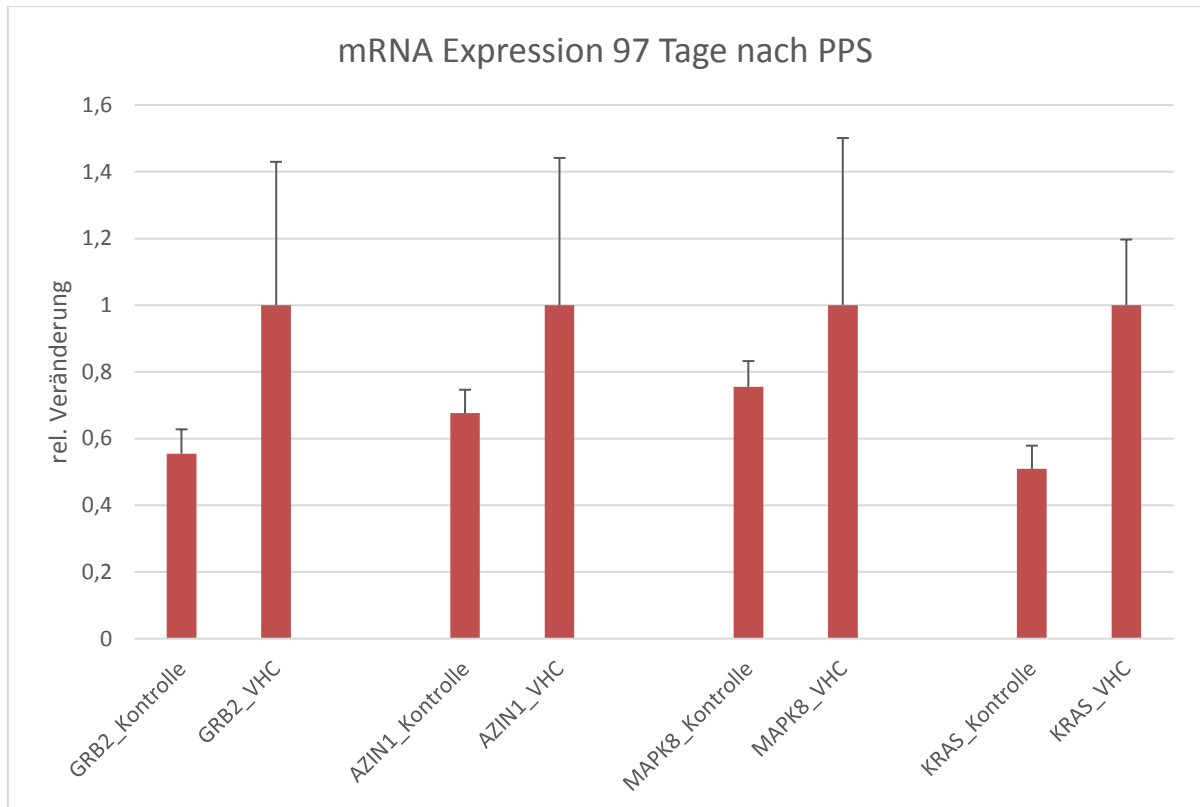


Abbildung 40 qPCR-Analyse von 4 potentiellen mRNA-Targets der miRNA-433-3p im Hippokampus von 3 VHC-stimulierten Ratten verglichen mit 3 nicht-Langzeit-stimulierten Ratten 97 Tage nach PPS. Gezeigt sind Expressionsveränderungen analysiert nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Die gemessenen Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant (T-Test).

#### 4.8. Signalweg-Analyse

Die Analyse der akut regulierten miRNAs zeigt einen signifikanten Einfluss im Fettsäureabbau. Der Signalweg mit dem zweithöchsten p-Wert für die akut regulierten miRNAs ist die Calcium-Reabsorption.

*Tabelle 8: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)-Signalwege, die mit einem p-Wert von  $<0,1$  als reguliert von den 8 beschriebenen miRNAs (miRNA-129-2-3p, miRNA-24-3p, let-7b-5p, miRNA-181a-1-3p, let-7d-3p, let-7e-5p, let-7d-5p, let-7a-1-3p) identifiziert wurden. Die Signalweg-Analyse wurde mit der DIANA Tool Software unter Verwendung der microT-CDS mit einem Schwellenwert von 0,8 erstellt. Aufgelistet sind hier ausschließlich Signalwege, Krankheiten die bei der Analyse aufgelistet wurden, sind hier nicht angezeigt.*

Signalweg	p-Wert	miRNA	mRNAs, die als Ziel vorhergesagt wurden	miTG score
Fettsäureabbau	0,00002	Let-7b-5p	Enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (Ehhadh)	0.982
		Let-7e-5p	Enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (Ehhadh)	0.984
		Let-7d-5p	Enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (Ehhadh)	0.853
		miRNA-24-3p	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 6 (Acsl6)	0.919
		miRNA-129-2-3p	Acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain (acadm)	0.979
Calcium Reabsorption	0,00569	Let-7a-1-3p	ATPase transporting Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> subunit beta 3 (Atp2b1)	0.868
			Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 5 (Trpv5)	0.813
		Let-7d-5p	ATPase plasma membrane Ca <sup>2+</sup> transporting 1 (Atp1b3)	0.927

Die Analyse der fünf miRNAs, die in der Kontrollgruppe reguliert waren und in der VHC-DBS-Gruppe, sowie den zusätzlichen Kontrollgruppen keine Regulation aufwiesen, zeigte einen starken Einfluss im N-Glycan-Biosynthese-Signalweg. Die meisten Gene wurden im MAPK (mitogen activated protein kinase)-Signalweg vorhergesagt.

*Tabelle 9: KEGG-Signalwege, die mit einem p-Wert von <0,1 als reguliert von den 5 beschriebenen miRNAs (miRNA-129, miRNA-379-3p, miRNA-410-3p, miRNA-433-3p und miRNA-431) identifiziert wurden. Die Signalweg-Analyse wurde mit der DIANA Tool Software unter Verwendung der microT-CDS mit einem Schwellenwert von 0,8 erstellt.*

Signalweg	P-Wert	miRNA	mRNAs, die als Ziele vorhergesagt wurden	miTG score
N-Glycan Biosynthese	0,00003	miRNA-129-5p	Mannosidase, alpha, class 1A, member 1 (Man1a1)	0,974
		miRNA-431	Mannosidase, alpha, class 1A, member 2 (Man1a2)	0,941
		miRNA-410-3p	Mannosidase, alpha, class 1C, member 1 (Man1c1) alpha-1,6-mannosyltransferase (ALG12)	0,845 0,824
MAPK-Signalweg	0,00007	rno-miRNA-410-3p	Neurotrophic receptor tyrosine kinase 2 (Ntrk2)	0,909
			SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1 (sos1)	0,871
			Nemo like kinase (Nlk)	0,810
			Dual specificity phosphatase 2 (Dusp2)	0,879
				0,907
			Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (Nr4a1)	0,963
			Neurotrophin 3 (Ntf3)	0,978
			Rap1a	0,876
			Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 3 (Lamtor3)	0,970
			Platelet derived growth factor receptor alpha (Pdgfra)	0,817
			Fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2)	
		rno-miRNA-431	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1 (Tab1)	0,932
			Rap guanine nucleotide exchange factor 2 (Rapgef2)	0,896
		rno-miRNA-129-5p	Prkx	0,976
			Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (Map4k4)	0,907
			Dual specificity phosphatase 10 (Dusp10)	0,947
			c-Fos	0,892
			Fibroblast growth factor 13 (Fgf13)	0,941
				0,945
			Calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 2 (Cacng2)	0,0855
				0,849
			ELK4, ETS transcription factor (Elk4)	
			TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2 (Tab2)	
		rno-miRNA-379-3p	Dual specificity phosphatase 10 (Dusp10)	0,854
			Protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha (Ppp3r1)	0,918
			Dual specificity phosphatase 8 (Dusp8)	0,823

		rno-miRNA-433-3p	Ribosomal protein S6 kinase A5 (Rps6ka5)	0,933
Ras-Signalweg	0.00554	rno-miRNA-410-3p	SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1 (Sos1)	0,871
			Vascular endothelial growth factor A (Vegfa)	0,981
			ETS proto-oncogene 1, transcription factor (Ets1)	0,986
			member of RAS oncogene family	0,978
			Colony stimulating factor 1 (RAP1A)	0,908
			Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-5 (Gng5)	0,851
			Platelet derived growth factor receptor alpha (Pdgfra)	0,970
			Fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2)	0,817
		rno-miRNA-129-5p	Prkx	0,976
			Ets1	0,903
			Insulin-like growth factor 1 (Igf1)	0,830
			KIT ligand (Kitlg)	0,820
			Fgf13	0,941
			Calm1	0,879
			RalA binding protein 1 (Ralbp1)	0,801
			P21 (RAC1) activated kinase 7 (Pak7)	0,835
			Phospholipase C, epsilon 1 (Plce1)	0,829
		rno-miRNA-433-3p	P21 (RAC1) activated kinase 4	0,849
		rno-miRNA-431	RAB5B, member RAS oncogene family (Rab5b)	0,919

## 5. Diskussion

### 5.1. Evozierte Potentiale

Während der Stimulation der FF und der VHC ließen sich aus dem DG evozierte Potentiale (EP) aus 3 sich überlagernden Komponenten ableiten. Aufgrund der kurzen Latenz ist (analog zu Ergebnissen elektrischer Fornix-Stimulation in Schafen; Stypulkowski et al., 2017) eine antidrome Aktivierung hippokampaler Efferenzen der wahrscheinlichste Entstehungsmechanismus für die früheste Komponente. Eine direkte oder indirekt via CA3-Pyramidenzellen vermittelte Verbindung zwischen FF und dem Hilus des DG, in dem auch die EEG-Ableitung in der vorliegenden Arbeit erfolgte, wurde an Hirnschnitten von Ratten nachgewiesen (Scharfman, 1993). Im Papez-Kreis projiziert CA3 via FF und VHC über das Corpus mamillare, ANT, Gyrus cinguli, den parahippokampalen Kortex, entorhinalen Kortex und über den PP zurück zum Hippokampus. Eine orthodrome Erregungsausbreitung über diesen Weg kann die späteren Komponenten der EPs erklären.

Die erste positive Komponente hatte eine Latenz von etwa 2,5 ms. Der geometrisch kürzeste Abstand zwischen den Elektroden spitzen der Stimulation und Ableitung lag sowohl bei VHC- als auch bei FF-Stimulation bei etwa 1,9 mm. Geht man von einer Leitungsgeschwindigkeit von etwa 1-3 m/s aus, welche der ungefähren Axonen-Leitungsgeschwindigkeit bei Säugern entspricht (Swadlow und Waxman, 1975), ergibt sich eine Mindestdauer der antidromen Reizweiterleitung von der Stimulations- zur Ableitelektrode von 1,9-5,7 ms. Da der reale zurückgelegte Weg der Reize mehr als 1,9 mm beträgt, passt die Größenordnung der Latenz des ersten peaks gut zur Latenz bei angenommener antidromer Reizweiterleitung.

Elektrophysiologische Untersuchungen an Epilepsiepatienten zeigten ähnliche EP-Morphologien nach Stimulation des Fornix und Ableitung aus dem Hippokampus (Miller et al., 2015). Analoge Daten für die VHC-Stimulation liegen nicht vor und werden hier erstmals beschrieben.

Bei Experimenten mit stereotaktischen Elektrodenimplantationen werden geeignete Koordinaten meist anhand von Atlanten ermittelt. Erst nach Abschluss der Experimente kann histologisch ermittelt werden, ob die Elektrode korrekt platziert war, sofern der Versuch keine anderweitige Verwendung des Hirngewebes erfordert. Die Trefferquoten stereotaktischer Implantationen variieren je nach intendiertem Ziel und liegen teilweise im Bereich von nur ca. 50 % (Vale-Martínez et al., 1999). Insbesondere bei lang andauernden Experimenten erlaubt die Ableitung von EP, die mit hoher Zuverlässigkeit

die Elektrodenlage bereits intraoperativ zu Beginn des Experimentes feststellt (Koubeissi et al., 2013), erhebliche Einsparungen von Versuchstieren, Experimentalzeiten und Sachmitteln. Die hier gezeigten Ergebnisse sind daher von hoher Relevanz für mögliche zukünftige Stimulationsexperimente im Bereich der FF und der VHC.

## 5.2. Klinische Effekte der DBS

Zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen belegen Effekte der DBS verschiedener Ziele auf unterschiedliche Outcome-Parameter. Meist wurden Effekte auf bereits manifeste Epilepsien oder auf akut symptomatische Anfälle untersucht. Zur Wirkung der DBS auf die Epileptogenese liegen dagegen wenige Daten vor, da die Epileptogenese in vielen Tiermodellen sehr kurz ist und so eine Intervention mittels DBS während dieser Phase nur selten getestet wurde. Da die Epileptogenese ein klinisch stummer Prozess ist, für den keine Biomarker etabliert sind, war es bisher auch nicht möglich, Studien zu deren Verlauf an Menschen durchzuführen. Tabelle 10 stellt eine Übersicht einiger Paradigmen dar, welche in Tierversuchen als antiepileptogen, antiepileptisch oder antikonvulsiv nachgewiesen wurden.

*Tabelle 10: Übersicht einiger wirksamer DBS-Paradigmen in Tiermodellen*

ANT: Anteriorer Nukleus des Thalamus; HFS: high-frequency stimulation; LFS: low-frequency stimulation; TNF: Tumornekrosefaktor, IL: Interleukin

Modell	DBS	Wirkung	Untersuchter Mechanismus	Referenz
Anfallsmodell (Maus, PTZ)	ANT vor und während PTZ-Injektion	Antikonvulsiv/ Toleranz/	Erhöhte Ausschüttung von Noradrenalin im ANT	(Ziai et al., 2005)
Epilepsie-modell (Maus, systemisches-injiziertes Pilocarpin)	HFS des ANT 7 Tage vor Pilocarpin-Injektion	Antikonvulsiv/ Toleranz	-	(Hamani et al., 2004)
Epilepsie-modell (Maus; systemisch-injiziertes Kainat)	HFS des Hippokampus	Antiepileptogen	-	(Van Nieuwenhuysen et al., 2012)
Epilepsiemodell (Maus, intrahippocampal-injiziertes Kainat)	LFS des ANT nach dem ersten spontanen Anfall	Antikonvulsiv/ Antiepileptisch	-	(Wang et al., 2016b)

Epilepsiemodell (Ratte, Amygdala-Stimulation)	LFS der VHC nach dem ersten spontanen Anfall	Antikonvulsiv/ Antiepileptisch	-	(Rashid et al., 2012)
Epilepsiemodell(Maus, „gain-of-function“-Mutation von SCN2A)	LFS der VHC nach dem ersten spontanen Anfall	Antiepileptisch/Antikonvulsiv	-	(Kile et al., 2010)
Epilepsiemodell (Ratte, systemische-injiziertes Kainat)	HFS des ANT nach dem ersten spontanen Anfall (1 Monat nach KA-Injektion)	Antikonvulsiv	Unterdrückung der Hochregulation von IL-1 $\beta$ , IL-1R, IL-6, IL-6R, gp130, TNF- $\alpha$ und TNF-R1	(Chen et al., 2017)
Epilepsiemodell (Ratte, intraamygdalär-injiziertes Kainat)	LFS der Amygdala nach KA-Injektion	Antikonvulsiv		Urino (2010)
Epilepsiemodell (Maus, Pilocarpin, systemisch/intrahippokampal)	HFS des PP nach dem ersten spontanen Anfall	Antikonvulsiv	-	(Cymerblit-Sabba et al., 2013)
Amygdala-Kindling (Ratte)	LFS der Amygdala nach Kindling-Stimulus	Antiepileptogen	Verstärkte Bindung der jeweiligen Liganden an Benzodiazepin-Rezeptoren und verringerte Bindung an Opioid-Rezeptoren	(López-Meraz et al., 2004)
Amygdala-Kindling (Ratte)	HFS der Substantia Nigra pars reticulata (SNr) vor Kindling-Stimulus	Antikonvulsiv/ Toleranz	-	(Shi et al., 2006)
Amygdala-Kindling (Ratte)	LFS der Amygdala vor Kindling-Stimulus	Antiepileptogen/ Toleranz	-	(Goodman et al., 2005)
Amygdala-Kindling (Ratte)	LFS der CA3 nach Kindling-Stimulus	Antiepileptogen/ Toleranz		Sun et al., (2010)
PP-Kindling (Ratte)	LFS des PP nach Kindling-Stimulus	Antiepileptogen	Aktivierung des Adenosin-Rezeptors A <sub>1</sub> , Unterdrückung	(Mohammad-Zadeh et al., 2009)

der Hochregulation  
von cAMP

Hippokam-pales (Ratte)	Kindling	HFS des ventralen Hippokampus nach dem Kindling- Stimulus	Antiepileptogen	(Cuellar- Herrera et al., 2006)
---------------------------	----------	--	-----------------	---------------------------------------

In dem hier beschriebenen Tierversuch wurde eine verlängerte Latenzperiode durch LFS (1 Hz, 1 V) der VHC während der Epileptogenese festgestellt. Der Effekt der VHC-DBS während der Epileptogenese wurde bislang nicht untersucht.

Die Applikation von VHC-DBS nach Manifestation der Epilepsie (Gruppe 19) führte zu einer signifikant reduzierten Anfallsfrequenz im Vergleich zu der VHC-Kontrollgruppe (Gruppe 22). Diese Differenz lässt sich allerdings auf eine unerwartet hohe Anfallsfrequenz in der VHC-Kontrollgruppe (Gruppe 22) zurückführen, da der Effekt im Vergleich zu den anderen Kontrollgruppen (ohne VHC-Elektroden; Gruppe 20 und 21) nicht vorhanden war. Dieser Befund lässt daher eine prokonvulsive Wirkung der Elektrodenimplantation in die VHC vermuten. Der Befund sollte bei zukünftigen Studien mit Stimulation der VHC beachtet werden. Der Mechanismus ist nicht geklärt. Rashid et al. untersuchten ein ähnliches Stimulationsparadigma (allerdings mit intermittierender Stimulation: 1 h ON und 15 min OFF) bei manifester Epilepsie und berichten ebenfalls von einer verringerten Anfallsfrequenz während und nach VHC-DBS. Dabei wurde außerdem eine verringerte Spike-Frequenz während und nach der VHC-DBS detektiert (Rashid et al., 2012). Als Mechanismen wurden eine verstärkte Inhibition durch Aktivierung des GABA-Benzodiazepin- und endogenem Opioid-Systems (López-Meraz et al., 2004) sowie ein möglicher Einfluss von Adenosin durch Aktivierung des A1-Rezeptors (Mohammad-Zadeh et al., 2009) diskutiert. In einem genetischen Epilepsie-Mausmodell („gain-of-function“-Mutation des SCN2A-Gens, welches für einen spannungsgesteuerten Natrium-Kanal kodiert), wurde eine verringerte Anfallsfrequenz während und nach VHC-DBS mit 3 Hz und  $\leq 400 \mu\text{A}$  und einem 50 %-Powerzyklus (5 min ON, 5 min OFF) gezeigt (Kile et al., 2010). Als Mechanismus wurde hier eine synaptische Langzeit-Depression (long-term depression; LTD) durch antidrome Exzitation der CA3-Region und gleichzeitige synaptische Aktivierung der präsynaptischen Zelle über den Papez-Kreislauf vorgeschlagen. Ein postsynaptisches Aktionspotential, welches einem EPSP vorausgeht, kann die Amplitude folgender EPSPs reduzieren, woraus geschlossen wurde, dass die antidrome Stimulation der CA3-Region und die gleichzeitige orthodrome Aktivierung über den Papez-Kreislauf, zu einer



Abschwächung von EPSP zwischen den Moosfasern und den CA3-Neuronen führen kann (Markram et al., 1997). Die nachgewiesene Reduktion der Anfallsfrequenz in der Studie von Kile et al. war verglichen mit dem Effekt in dem Amygdala-Stimulationsmodell (Rashid et al., 2012) gering (21 % im Mutationsmodell, 57 % im Amygdala-Stimulationsmodell nach VHC-DBS, 90 % während VHC-DBS), was auf Unterschiede in den verwendeten Modellen und in den Stimulationsparametern zurückzuführen sein kann. Diese Studien enthalten keine Angabe darüber, wie viele Anfälle bei dem verwendeten Modell ohne zusätzlich implantierte VHC-Elektroden auftreten. Eine frühere Studie berichtete eine hohe Varianz der Anfallsfrequenz im gleichen Modell (Nissinen et al., 2000; Nissinen und Pitkänen, 2007). Daher ist ein Einfluss der Implantation der VHC-Elektrode auf die Anfallsfrequenz in den beschriebenen Studien von Rashid et al. und Kile et al. nicht auszuschließen. Abbildung 17 zeigt, dass in dem hier verwendeten PPS Modell die Anfallsfrequenz mit der Zeit zunimmt, was ebenfalls die Abweichung unserer Ergebnisse von denen von Rashid et al. (2012) erklären könnte, da dort nur Angaben über die Anfallsfrequenz 2 Wochen nach DBS gegeben sind.

Die FF-Stimulation mit 5 Hz führte bei einigen Ratten zu einer Verlängerung der Latenzperiode, allerdings war die Latenz in dieser Gruppe sehr variabel. Wie es zu Abweichungen innerhalb einer Behandlungsgruppe kommen könnte, ist in Absatz 5.6 beschrieben. Da es sich bei der FF um eine vergleichsweise kleine Struktur handelt und außerdem die Implantation von Stimulationselektroden in die FF eine neu etablierte Methode ist, könnte eine imperfekte Platzierung der Elektroden zu Abweichungen in der Ergebnissen geführt haben. Ein Zusammenhang zwischen der Latenz und anderen Parametern (Alter der Ratten zum Zeitpunkt der OP, Größe der SAP während der PP-Elektroden-Implantation, Auftreten akut symptomatischer Anfälle) konnte nicht festgestellt werden.

Die Stimulation des DG und des PP während der Epileptogenese führten ebenfalls nicht zu signifikanten Effekten auf die Latenzperiode. Da zahlreiche Stimulationsparameter (Gesamtdauer, ON-OFF-Zyklen, Frequenz, Amplitude, Impulsform, Dauer und Verteilung der Einzelimpulse, Polarität, Phase u.a.) variiert werden können, schließen negative Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine prinzipielle Eignung der untersuchten Stimulationsziele nicht aus.

Ein möglicher Wirkmechanismus der DBS ist das Ausschalten des stimulierten Areals (Magariños-Ascone et al., 2002). In einer früheren Studie im 30-30-8-PPS Modell wurde gezeigt, dass das Durchtrennen des PP während der Epileptogenese nicht zu einer Verlängerung der Latenz führt (Meyer et al., 2016), was daran liegen könnte, dass der PP zwar die Haupteingangsbahnen der Hippokampus darstellt, allerdings auch andere

Eingangsbahnen existieren (Deller et al., 1996; van Strien et al., 2009). Für die hier vorgestellten Daten könnte eine weitere Erklärung sein, dass eine 7-tägige Stimulation zu kurz war, um die Latenz signifikant zu verlängern, und nur durch die 14-tägige DBS, welche nur für die VHC durchgeführt wurde, ein Effekt zu beobachten war. Diese Hypothese müsste in einem neuen Versuchsaufbau überprüft werden.

In klinischen Studien werden vorwiegend hochfrequente Stimulationsparadigmen zur Behandlung manifester Epilepsien verwendet (Laxpati et al., 2014). Die bereits zugelassenen Hirnstimulationsverfahren beruhen ebenfalls auf HFS (ANT Stimulation: 145 Hz, Responsive Neurostimulation: 200 Hz; Schulze-Bonhage, 2017). Auch die LFS wurde an Patienten getestet. In einer Fallserie führte eine LFS (0,5 Hz) der Anfallsursprungszone in 4 von 5 Fällen zur Reduktion der Anfallsfrequenz (Schrader et al., 2006). Die LFS des Nucleus caudatus mit 4 bis 8 Hz führte in einer 57 Patienten umfassenden Studie zu einer Anfallsreduktion, was mit einer Aktivierung inhibitorischer Netzwerkaktivitäten begründet wurde (Chkhenkeli et al., 2004). Es existieren allerdings noch keine randomisierten Doppelblind-Studien zur LFS bei Epilepsie.

### 5.3. Einfluss der VHC-DBS auf mikroRNAs

Ein Einfluss der DBS auf die miRNA-Expression wurde bislang in einer klinischen Studie nachgewiesen, die die miRNA-Expressionsmuster in Leukozyten von Patienten mit M. Parkinson vor und nach Beginn einer DBS des Nucleus subthalamicus im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen untersuchte (Soreq et al., 2013). Dabei wurden 3 miRNAs (miRNA-4317, miRNA-143, miRNA-424) identifiziert, die nach DBS signifikant hochreguliert waren, 8 miRNAs (miRNA-424-3p, miRNA-210, miRNA-93, miRNA1249, miRNA-4293, miRNA-378c, miRNA-18b-3p, miRNA-20a) waren signifikant herunterreguliert, wobei die 5 zuletzt genannten damit entgegengesetzt zur gemessenen Regulation zwischen Parkinson-Patienten und gesunden Kontrollen reguliert waren. Analysiert wurden außerdem Splice-Isoformen in vorhergesagten miRNA-Bindestellen. Eine Anhäufung alternativer Splice-Varianten nach DBS wurde im Zusammenhang mit einem möglichen Einfluss auf den MAPK-Phosphatase-Export aus dem Nukleus sowie Ubiquitin-Homöostase festgestellt. In einem Tierexperiment zur Neuroprotektion durch die elektrische Stimulation der Nuclei fastigii bei einem Rattenmodell zerebraler Ischämie wurde eine Regulation mehrerer miRNAs im Kortex gemessen (Feng et al., 2015). Der miRNA-29-c wurde eine Rolle in dem neuroprotektiven Mechanismus der Stimulation der Nuclei fastigii durch Regulation von Birc2 und Bak1 zugeschrieben. Birc2 und Bak1 spielen eine Rolle bei Apoptose-Mechanismen (Huang et al., 2015).

Untersuchungen zum Einfluss der DBS auf die miRNA-Expression bei Epilepsien liegen nicht vor. Die Wirkmechanismen der DBS sind weitgehend unbekannt. MiRNAs sind in zahlreiche Mechanismen, die zu veränderter Hirnaktivität führen, involviert und haben Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf von Epilepsien (vgl. 2.4.3), so dass miRNAs plausible Kandidaten für die Vermittlung biologischer DBS-Effekte sind. Tatsächlich wurden in der vorliegenden Arbeit 27 miRNAs identifiziert, die nach VHC-DBS im Vergleich zu den Kontrollen differentiell exprimiert waren. Diese differentielle Expression kann entweder direkt durch die VHC-DBS oder indirekt durch reaktive, endogene Mechanismen im Rahmen der Beeinflussung der Epileptogenese durch VHC-DBS hervorgerufen worden sein (Walker et al., 2002). Ein direkter Einfluss wiederum kann in der Herauf- oder Herunterregulation der Expression von miRNAs in der VHC-DBS-Gruppe, oder in der Unterdrückung der Herauf- bzw. Herunterregulation im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Induktion der Epileptogenese bestehen.

Die PCA (Abbildung 21) zeigt eine deutliche Clusterung der Daten der verschiedenen Versuchsgruppen. Die späten Zeitpunkte lassen sich von den früheren Zeitpunkten unterscheiden, welche wiederum mit den Kontrollen clustern. Außerdem sind die PCA-Koordinaten der VHC-stimulierten Ratten näher an denen der Kontrollgruppe ohne Anfälle, als an den Kontrollen nach 97 Tagen, was als weniger fortgeschrittene Epileptogenese-assoziierte miRNA-Regulation nach VHC-DBS interpretiert werden kann.

Die durch VHC-DBS differentiell regulierten miRNAs lassen sich in Gruppen gleicher Regulationsmuster unterteilen. MiRNAs, die direkt nach der VHC-DBS signifikant reguliert waren, könnten einen unmittelbaren Einfluss der VHC-DBS widerspiegeln. Direkt nach der VHC-DBS waren 3 miRNAs (miRNA-129-2-3p, miRNA-24-3p, let-7b-3p) signifikant niedriger exprimiert als in der Kontrollgruppe, 5 miRNAs (miRNA-181a-1-3p, let-7d-3p, let-7e-5p, let-7d-5p, let-7a-1-3p) waren signifikant höher exprimiert. In den folgenden Absätzen sind mögliche Zusammenhänge dieser Regulationen mit der Unterdrückung der Epileptogenese beschrieben.

➤ miRNA-129-2-3p:

Diese miRNA war im Epilepsiemodell der Ratte (systemisch injiziertes Pilocarpin) in der Epileptogenesephase und bei manifester Epilepsie hochreguliert (Roncon et al., 2015). In menschlichem Kortexgewebe von refraktären TLE-Patienten wurde ebenfalls eine Hochregulation verglichen zu Kontrollgewebe gemessen (Miller-Delaney et al., 2015; Sun et al., 2016).

Im EpimiRNA-Epileptogenese-Projekt wurde ebenfalls eine leichte Hochregulation 24 h und einen Monat nach dem ersten Anfall gemessen (EpimiRNA-Epileptogenese-Projekt, unveröffentlichte Daten). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich direkt nach der VHC-DBS eine signifikant niedrigere Expression in den VHC-stimulierten Ratten (Gruppe 11) verglichen mit der Kontrollgruppe (Gruppe 23). Die VHC-DBS unterdrückt also anscheinend die PPS-induzierte Hochregulation der miRNA-129-2-3p. MiRNA-129-2-3p ist im 30-30-8-PPS Modell vergleichsweise niedrig exprimiert (100 bis 200 rpm), was die Wahrscheinlichkeit eines starken Einflusses dieser Regulation gering macht. Nach 97 Tagen war kein Unterschied mehr zwischen den VHC-stimulierten Ratten und den Kontrollratten zu messen.

➤ miRNA-24-3p:

Die miRNA-24-3p zeigt in unseren Daten eine ähnliche Expression wie die miRNA-129-2-3p also eine signifikant niedrigere Expression in den VHC-stimulierten Ratten (Gruppe 11) als in den Kontrollratten (Gruppe 23) direkt nach der DBS. Auch die Regulation dieser miRNA könnte einen akuten Effekt der VHC-DBS darstellen. In einem früheren Experiment, dessen Ergebnisse in Abbildung 31 B dargestellt sind (EpimiRNA-Epileptogenese-Projekt, unveröffentlichte Daten), war die Expression der miRNA-24-3p 24 h und einen Monat nach dem ersten Anfall erhöht, nach 3 Monaten war kein Unterschied mehr zwischen den VHC-stimulierten und den Kontrollratten zu messen. Die miRNA-24-3p war im Epilepsiemodell während der Latenzphase (24 h nach systemisch appliziertem Pilocarpin bei Ratten; Hu et al., 2011) hochreguliert. Ebenfalls nach systemisch injiziertem Pilocarpin bei Ratten wurde eine Hochregulation in der Latenzphase gemessen, welche dann nach dem ersten Anfall abnahm und in der manifesten Epilepsie (12 h nach dem ersten spontanen Anfall) wieder komplett rückläufig war (Roncon et al., 2015). Diese Daten könnten auf einen pathologischen Effekt einer Hochregulation der miRNA-24-3p während der Epileptogenese hinweisen, welcher durch die VHC-DBS inhibiert wurde.

Im Serum von Patienten mit Multipler Sklerose wurde eine Hochregulation der miRNA-24-3p gemessen, welche mit dem Krankheitsprogress korrelierte (Vistbakka et al., 2018). Als Mechanismus wird hier die Verstärkung der Apoptose durch Herunterregulation von BIM und PUMA (Wang et al., 2016a), eine Regulation der Inflammation über Interferon- $\gamma$  (Fayyad-Kazan et al., 2014) und IL-4 (Pua et al., 2016), sowie ein Einfluss auf die Aldosteron- und Cortisol-Biosynthese diskutiert (Robertson et al., 2013). Aldosteron ist ebenfalls in inflammatorische Prozesse involviert (Herrada et al., 2010) und reguliert VEGF-A (Walczak et al., 2011), welches

die Blut-Hirn-Schranke (blood-brain barrier, BBB) öffnen kann (Argaw et al., 2012). Eine Öffnung der BBB wurde bereits nach Auftreten epileptischen Anfälle im Epilepsie-Rattenmodell (PPS) und bei TLE-Patienten nachgewiesen, und eine Korrelation zwischen der BBB-Permeabilität und der Frequenz spontaner Anfälle bestand ebenfalls im Rattenmodell (Vliet et al., 2007). Die BBB-Permeabilität wurde anhand der Albumin-Konzentration bestimmt, welche als Indikator für eine eingeschränkte BBB-Funktion dienen kann (Cornford und Hyman, 1999).

Im Blut von Patienten mit Depressionen (major depressive disorder) sowie im Blut von Mäusen in einem Modell für Depressionen wurde die miRNA-24-3p als herunterreguliert nach erfolgreicher Behandlung mit verschiedenen Antidepressiva verglichen mit Placebo-Kontrollen und Non-Respondern (Lopez et al., 2017) gemessen. Zusammen mit den ebenfalls differentiell regulierten miRNAs 146a-5p, 146b-5p und 425-3p wurde diese anhand bioinformatischer Analysen (Signalweganalyse mit DAVID und DIANA:miRPath) als involviert in den MAPK/Wnt-Signalweg identifiziert, welcher somit in den Wirkmechanismus von Antidepressiva involviert sein könnte. Eine microArray-Analyse der Blutproben zur Untersuchung des Expressionsmusters vorhergesagter mRNAs des Wnt/MAPK-Signalwegs von behandelten Patienten und Non-Respondern bestätigte diese Hypothese. *In vitro* Versuche mit humanen Progenitor Zellen bestätigten die Herunterregulation der miRNAs und die Hochregulation des Wnt/MAPK-Signalwegs nach Behandlung mit Antidepressiva. Außerdem wurde der Calcium-Signalweg als reguliert identifiziert.

Die genannten Signalwege/Prozesse (Inflammation, Apoptose, Öffnung der BBB, MAPK/Wnt-Signalweg, Calcium-Signalweg), die in den beschriebenen Studien identifiziert wurden, könnten auch in unserem Tiermodell an den von miRNA-24-3p beeinflussten Prozessen beteiligt sein und einen möglichen Einfluss auf die Epileptogenese haben, wodurch eine VHC-Stimulationsinduzierte Unterdrückung der miRNA-24-3p-Hochregulation antiepileptogen wirken könnte.

#### ➤ let-7b-5p:

Let-7b-5p war direkt nach der VHC-DBS (Gruppe 11) signifikant niedriger exprimiert als in der Kontrollgruppe (Gruppe 23). Abbildung 32 B zeigt eine Hochregulation der let-7b-5p 1 h und 24 h nach PPS (EpimiRNA-Epileptogenese-Projekt, unveröffentlichte Daten). Im Epilepsiemodell (Maus, systemisch-injiziertes Pilocarpin) wurde während der Epileptogenese eine Herunterregulation gemessen (Risbud und Porter, 2013). Unsere Daten zeigen außerdem eine Herunterregulation einen Monat nach dem ersten Anfall. In einem Anfallsmodell (Maus, 6 Hz-Cornea-

Stimulation) war Let-7b-5p 3 h, 6 h und 24 h nach induzierten Anfällen hochreguliert (Kretschmann et al., 2014). Die Hochregulation durch Anfälle könnte mit der Aktivierung kompensatorischer Mechanismen assoziiert sein, welche durch die VHC-DBS verstärkt werden könnten.

Bei TLE-Patienten mit HS wurde eine Herunterregulation von let-7b-5p im Hippokampus verglichen mit Autopsie-Kontrollen gemessen (McKiernan et al., 2012), was im Gegensatz zu den beschriebenen Daten aus Tierversuchen steht.

Außerdem wurde die let-7b-5p als hochreguliert im Hypothalamus nach Induktion chronischer Elektroakupunktur-Toleranz beschrieben (Cui et al., 2017). Elektroakupunktur wird als analgetische Behandlung eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass wiederholte Elektroakupunktur zur Toleranz weiterer Behandlungen mit diesem Verfahren führen kann und dass diese Toleranz mit einer Abnahme von Opioid-Rezeptoren einhergeht. Außerdem sind NMDA-Rezeptoren, 5-Hydroxytryptamine, Calcium und Norephrinephrin in den Vorgang der Toleranzentwicklung involviert, wobei die genauen Mechanismen unbekannt sind. Im Hypothalamus waren 49 miRNAs nach Induktion von Elektroakupunktur-Toleranz differentiell reguliert. Eine Signalweganalyse ergab einen möglichen Einfluss auf den MAPK-Signalweg, den Abbau von Valin, Leucin und Isoleucin, Lysosomen, des Fettsäuremetabolismus, den Calcium-Signalweg sowie weitere Prozesse.

#### ➤ miRNA-181a-1-3p

miRNA-181a-1-3p war 14 Tage nach PPS in der VHC-stimulierten Gruppe (Gruppe 11) höher exprimiert als in der Kontrollgruppe (Gruppe 23). Nach 97 Tagen war die Expression bei den VHC-stimulierten Ratten (Gruppe 10) fast unverändert zu den VHC-Ratten nach 14 Tagen. Bei den Kontrollratten (Gruppe 22) war die Expression nach 97 Tagen angestiegen, wodurch diese dann höher als in den VHC-stimulierten Ratten zu diesem Zeitpunkt war. Die unveröffentlichten Daten des EpiRNA-Epileptogenese-Projekts zeigen eine Herunterregulation in der späten Epileptogenese und bei manifester Epilepsie (24 h und 1 Monat nach dem ersten Anfall). In einem Ratten-Epilepsiemodell (Pilocarpin-induzierter SE) wurde eine Herunterregulation in der chronischen Phase gemessen (Roncon et al., 2015). Dieses Expressionsmuster kann so interpretiert werden, dass sowohl eine frühe Herunterregulation als auch eine Hochregulation in der chronischen Phase der Epilepsie durch die VHC-DBS unterdrückt wurde.

Verschiedene mRNAs von Proteinen des Lipid-Metabolismus (PDE3B, LPL, PPAR $\gamma$ , GLUT1, GLUT4, adiponectin und FASN) wurden als Ziele der miRNA-181a-1-3p in

Adipozyten erkannt (Li et al., 2013a). Der Fettsäureabbau wurde auch für die, in unserem Modell nach VHC-Stimulation differentiell exprimierten miRNAs, als möglicherweise beeinflusst identifiziert, was im Zusammenhang mit der Signalweganalyse diskutiert wird. Ebenfalls Li et al. (2013) identifizierten TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor) als Ziel der miRNA-181a-1-3p und validierten den Befund mittels Luziferase-Assay. Außerdem wurde gezeigt, dass miRNA-181a-1-3p in die Immunantwort von Makrophagen involviert ist, indem sie TNF- $\alpha$  reguliert (Li et al., 2017). Die Rolle von TNF- $\alpha$  in der Epileptogenese ist unklar (Li et al., 2011). In tierexperimentellen Studien wurden sowohl pro- als auch antikonvulsive Effekte einer TNF- $\alpha$  Überexpression gezeigt. Es wird vermutet, dass die unterschiedlichen Effekte auf die Aktivierung zweier verschiedener Rezeptoren (p55 – Aktivierung vermutlich pro-convulsiv und p57 – Aktivierung vermutlich antikonvulsiv) zurückzuführen sind (Balosso et al., 2005) und dass ein dosisabhängiger Bezug zwischen pro- und antikonvulsiver Wirkung besteht (Yuhua et al., 2003). Der p55-Rezeptor ist in die Apoptose involviert, und der p57-Rezeptor aktiviert NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa beta), einen Transkriptionsfaktor, welcher unter anderem in die Immunantwort, den Zelltod und die Zellproliferation involviert ist (Natoli et al., 1997; Sheng et al., 2005).

➤ let-7d-3p:

Let-7d-3p war 14 Tage nach PPS in der VHC-DBS-Gruppe (Gruppe 11) signifikant höher exprimiert als in der Kontrollgruppe (Gruppe 23). Nach 97 Tagen hatte die Expression in beiden Gruppen zugenommen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den VHC-stimulierten und den Kontrollratten war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr vorhanden. Dies könnte einen akuten Effekt der VHC-DBS auf diese miRNA darstellen, der nach 97 Tagen nicht mehr zu messen war. B zeigt eine Hochregulation 24 h und einen Monat nach PPS. Insgesamt war die Expression dieser miRNA zwischen den beiden beschriebenen Versuchen sehr unterschiedlich, wodurch ein Vergleich der Daten schwer zu interpretieren ist.

Von Bot et al. wurde eine Herunterregulation während der späten Epileptogenese bei einem Epilepsiemodell der Ratte (Amygdala-Stimulation-induzierter SE) gemessen (Bot et al., 2013). Zu diesem Zeitpunkt hatten einige der Versuchstiere bereits spontane Anfälle entwickelt.

Unsere Daten legen eine VHC-DBS-induzierte Hochregulation der let-7d-3p nahe. Eine Epileptogenese-assoziierte Regulation wurde in unseren Daten nicht gemessen, die unterschiedliche Expression in den Versuchsgruppen nach 14 Tagen könnte auf die Aktivierung endogener Mechanismen zurückzuführen sein.

➤ let-7e-5p:

Die let-7e-5p zeigte sowohl 14 Tage (Gruppe 11) als auch 97 Tage (Gruppe 10) nach PPS eine höhere Expression in der VHC-DBS-Gruppe als in den Kontrollgruppen zum gleichen Zeitpunkt (Gruppe 22 und 23). In beiden Gruppen hatte die Expression nach 97 Tagen gegenüber 14 Tagen zugenommen.

In der frühen Epileptogenese im Epilepsiemodell (Pilocarpin) und 3 und 6 h nach induzierten Anfällen in einem Anfallsmodell bei Mäusen (6-Hz-Modell) war die let-7e-5p hochreguliert (Kretschmann et al., 2014). Zu einem etwas späteren Zeitpunkt der Epileptogenese nach Pilocarpin-induziertem SE wurde eine Herunterregulation gemessen (Risbud und Porter, 2013). Daten aus dem EpimiRNA-Epileptogenese-Projekt (EpimiRNA-Epileptogenese-Projekt, unveröffentlichte Daten) zeigen eine Herunterregulation 10 d nach PPS. Ein Entgegenwirken dieser möglicherweise pathologischen Herunterregulation durch VHC-Stimulation könnte an der antiepileptogenen Wirkung der Stimulation beteiligt sein.

In einem Epilepsiemodell der Ratte (systemisch injiziertes Pilocarpin-Modell) wurde außerdem eine Herunterregulation bei manifester Epilepsie gemessen (Song et al., 2011), was allerdings unseren Daten der chronischen Phase widerspricht.

Im Blut von Alzheimer-Patienten war die let-7e-5p herunterreguliert (Sato et al., 2015). Eine DIANA Signalweganalyse dieser und 13 weiterer herunterregulierter miRNAs ergab einen möglichen Einfluss auf den PI3K/Akt-Signalweg, welcher in Prozesse wie Stoffwechsel, Zellwachstum und Proliferation involviert ist. AKT ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase. Wichtige Proteine des Signalwegs sind unter anderem MAPK, NF- $\kappa$ B und TNF- $\alpha$ . In Makrophagen wurde gezeigt, dass LPS (Lippopolysaccharide), ein Ligand des „Toll-like“-Rezeptors TLR4, über AKT1, eine der drei Isoformen von AKT, zur Hochregulation u.a. von let-7e-5p führt und dass ein Knockdown von AKT1 eine LPS-induzierte Hochregulation der let-7e-5p verhindert. Mittels Luziferase-Assay wurde TLR4 als Ziel der let-7e-5p nachgewiesen (Androulidaki et al., 2009), wodurch ein „feedback-loop“ der TLR4-Aktivierung über let-7e-5p beschrieben wird.

TLRs sind eine Gruppe von sogenannten „Pattern Recognition“-Rezeptoren (PRRs). Sie sind Bestandteile des angeborenen Immunsystems, die Krankheitserreger anhand von sogenannten „Pathogen-Associated Molecular Patterns“ (PAMPs) identifizieren und intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren, die über Transkriptionsfaktoren die Immunabwehr aktivieren.



TLR4 ist unter anderem in LTP, LTD und Gedächtnisbildung involviert (Klein et al., 2018). TLR4 wurde in verschiedenen Tiermodellen der TLE als hochreguliert identifiziert (z. B. nach SE durch intrahippokampales KA in Mäusen (Iori et al., 2013)). Außerdem wurde gezeigt, dass TLR4-Knockoutmäuse resistent gegenüber KA-induzierten Anfällen sind (Maroso et al., 2010).

Im Blut von Patienten mit ischämischem Hirninfarkt wurde eine erhöhte Expression der let-7e-5p verglichen mit Kontrollen gemessen (Huang et al., 2016). Bioinformatische Analysen sowie Zellkulturversuche identifizierten 4 Zielgene des MAPK-Signalwegs (ETS-domain Protein (ELK4), Caspase 3 (CASP3), nemo-like kinase (NLK), und tumor protein p53 (TP53)) als Ziele der let-7e-5p. Der MAPK-Signalweg wurde in unseren Daten mittels Signalweganalyse als möglicherweise involviert in den Wirkmechanismus der DBS identifiziert. Der mögliche Einfluss des MAPK-Signalwegs auf die Epileptogenese ist im Absatz 0 beschrieben.

#### ➤ let-7a-1-3p:

Let-7a-1-3p war 14 Tage nach PPS in der VHC-DBS-Gruppe (Gruppe 11) signifikant höher exprimiert als in der Kontrollgruppe (Gruppe 23). Nach 97 Tagen war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Gruppe 10 und 22) mehr zu messen. Die Daten aus dem EpimiRNA-Epileptogenese-Projekt lassen keinen eindeutigen Schluss der Rolle dieser miRNA in der Epileptogenese zu, da keine konsistente Regulation zu messen war.

In einem Rattenmodell für fokale zerebrale Ischämie wurde die miRNA-Expression nach neuroprotektiver DBS des Nucleus fastigii (fastigial nucleus, FN) untersucht (Feng et al., 2015). Let-7a-1-3p war nach einstündiger FN-DBS ischämischer Ratten verglichen mit ischämischen Ratten ohne FN-DBS stark hochreguliert. Als mögliche Mechanismen wurden zahlreiche Signalwege identifiziert, unter anderem wurde „VEGF-signaling“ als von den hochregulierten miRNAs beeinflusster Signalweg genannt. Als FN-DBS induzierter Mechanismus wurde hier außerdem die Herunterregulation pro-apoptotischer Proteine (Birc2 und Bak1) nachgewiesen, welche allerdings durch eine andere miRNA (miRNA-29c-3p) induziert wurde. Neuroprotektive Mechanismen der FN-DBS, welche durch let-7-a-1-3p gesteuert werden könnten, könnten auch an der VHC-stimulationsinduzierten Inhibition der Epileptogenese beteiligt sein.

Mittels einer Clusteranalyse, dargestellt in Abbildung 23, können die beschriebenen miRNAs in Gruppen ähnlicher Expressionsmuster eingeteilt werden. Das für unsere Fragestellung interessanteste Expressionsmuster ist in Abbildung 24 O dargestellt und

zeigt die Expression von miRNA-129-5p, miRNA-433-3p, miRNA-431, miRNA-410-3p und miRNA-379-3p. Diese sind in der Kontrollgruppe nach 14 Tagen bereits leicht höher exprimiert als in den beiden Vergleichsgruppen (Gruppe 24: Kontrolle ohne PPS und Gruppe 25: Kontrolle ohne spontane Anfälle) und steigen bis zum 97. Tag weiter an. Aus den Expressionsmustern im Vergleich zu den Kontrollen lässt sich schließen, dass die erhöhte Expression nicht auf die PPS oder das Auftreten akut symptomatischer Anfälle zurückzuführen ist, da die Expression der Vergleichsgruppen niedrig ist. Das Fehlen einer Hochregulation bei den VHC-stimulierten Ratten könnte auf eine Unterdrückung der Expression dieser miRNAs im Zuge einer inhibierten Epileptogenese hindeuten. Ob eine Kausalität zwischen der Regulation der miRNAs und der Inhibition der Epileptogenese besteht, bleibt durch *in vivo* Manipulation zu überprüfen. Die Konzentration von miRNAs im Gehirn kann *in vivo* z. B. durch eine intracerebroventrikuläre Injektion von Oligonukleotiden, welche komplementär zu der manipulierten miRNA sind (Antagomire), herunterreguliert oder durch die Injektion von Mimics, welche eine zu der manipulierten miRNA identische Sequenz haben (Agomire), überexprimiert werden (Siehe Absatz 2.4.2).

Drei der 5 miRNAs, nämlich miRNA-379-3p, miRNA-410-3p und miRNA-431 gehören zum 379-410 miRNA-Cluster (Seitz et al., 2004). Zwei weitere miRNAs aus diesem Cluster (miRNA-323-3p und miRNA-369-3p) waren nach 97 Tagen (Tabelle 6, Spalte 3) in den VHC-stimulierten Ratten (Gruppe 10) signifikant niedriger exprimiert als in den Kontrollratten (Gruppe 22). Die Transkription dieses miRNA-Clusters wird durch neuronale Aktivität induziert, wie in primären Rattenneuronen gezeigt wurde (Fiore et al., 2009). Die miRNA-129-5p wurde ebenfalls als hochreguliert in hippokampalen Neuronen nach erhöhter neuronaler Aktivität durch PTX-Behandlung detektiert (Rajman et al., 2017). Die Hochregulation der genannten miRNAs könnte also durch erhöhte neuronale Aktivität in der manifesten Epilepsiephase induziert sein. Daher lässt sich vermuten, dass die Hochregulation dieser miRNAs nicht der Auslöser, sondern die Folge der Epileptogenese ist, wodurch diese als Kandidaten für eine *in vivo* Manipulation eher ungeeignet sind. Als Kandidat kommt daher besonders die miRNA-433-3p in Frage.

Im Vergleich mit Daten aus einem vorherigen Versuch, der die Expression der miRNAs während der Epileptogenese untersucht (EpimiRNA-Epileptogenese-Projekt, unveröffentlichte Daten), wurde eine erhöhte Expression der miRNA-433-3p und miRNA-129-5p während der frühen Epileptogenese und während der manifesten Epilepsie festgestellt, wodurch diese miRNAs als besonders geeignet für eine *in vivo* Manipulation eingestuft werden können.

➤ miRNA-129-5p:

Eine Hochregulation der miRNA-129-5p in dem hier verwendeten Epilepsiemodell (30-30-8-PPS) während der frühen Epileptogenese und in der manifesten Epilepsiephase wurde bereits von Rajman et al. (2017) beschrieben. In einem weiteren mTLE-Modell (Maus, intra-amygdalär injiziertes KA) wurde gezeigt, dass eine Antagonisierung der miRNA-129-5p vor Injektion von KA epilepsietypische EEG-Aktivität und die durchschnittliche Gesamtzeit auftretender Anfälle reduziert. MiRNA-129-5p ist notwendig für homöostatisches synaptisches Downscaling: In primären hippocampalen Rattenneuronen wurde mittels des GABA-A-Rezeptor-Blockers Picrotoxin (PTX) erhöhte Netzwerkaktivität und dadurch synaptisches Downscaling induziert. Dies wurde anhand verminderter Expression von AMPA-Rezeptoren verifiziert. Die Antagonisierung von miRNA-129-5p verhinderte das Downscaling vollständig. Als Ziele der miRNA-129-5p wurden die Calcium-Pumpe *Atp2b4* und Doublecortin (*Dcx*) identifiziert. Eine funktionelle Kopplung über das RNA-Bindeprotein RBfox wurde nachgewiesen (Rajman et al., 2017).

In hippocampalen Neuronen wurde *in vitro* gezeigt, dass miRNA-129-5p die neuronale Erregbarkeit durch Regulation des Kalium-Kanals Kv1.1 beeinflusst (Sosanya et al., 2013).

Eine Hochregulation dieser miRNA wurde auch bei manifester Epilepsie im Mausmodell nach Pilocarpin-induziertem SE festgestellt (Roncon et al., 2015). In menschlichem Gewebe von mTLE-Patienten wurde ebenfalls eine Hochregulation dieser miRNA gemessen (Miller-Delaney et al., 2015). Die hier gezeigten Daten bestätigen also die bisherigen Erkenntnisse, da auch in der vorliegenden Arbeit eine Hochregulation in der chronischen Phase gemessen wurde, die mittels VHC-DBS unterdrückt werden konnte. Zusätzlich wurde eine Hochregulation in der frühen Epileptogenese gemessen. Mit etwa 700 bis 1500 rpm ist diese miRNA mittelstark bis stark exprimiert und hat so eine potentiell starke Wirkung auf ihre Ziel-mRNAs.

#### ➤ miRNA-379-3p:

MiRNA-379-3p war ebenfalls in der Kontrollgruppe nach 97 Tagen (Gruppe 22) höher exprimiert als nach 14 Tagen (Gruppe 22). In den VHC-stimulierten Ratten wurde keine Hochregulation gemessen. Die Daten aus dem unveröffentlichten EpimiRNA-Projekt zeigen keine Hochregulation in der frühen chronischen Phase. Offenbar sind also indirekte Mechanismen für die Verhinderung der späten Hochregulation durch die mehrere Monate früher applizierte VHC-DBS verantwortlich.

Diese miRNA war 48 h nach Pilocarpin-induziertem SE herunterreguliert (Risbud und Porter 2013). Eine Hochregulation dieser miRNA in der chronischen Epilepsiephase wurde bisher nicht berichtet.

Zu weiteren Krankheitsassoziationen liegen bisher keine publizierten Daten vor.

➤ miRNA-433-3p:

MiRNA-433-3p zeigte ein mittelhohes Expressionslevel in unserem Modell (600 bis 1100 rpm).

Diese miRNA war in der Latenzphase im Pilocarpin-Modell herunterreguliert (Kretschmann et al., 2014; Risbud und Porter, 2013). Außerdem wurde eine Hochregulation in der chronischen Phase im Pilocarpin-Modell (Roncon et al., 2015) und nach Amygdala-Stimulation-induziertem SE (Bot et al., 2013) gemessen. Roncon et al. berichten allerdings eine Hochregulation bereits in der Latenzphase, was in Widerspruch zu den anderen erwähnten Studien steht. Unveröffentlichte Daten aus dem EpimiRNA-Epileptogenese-Projekt zeigen ebenfalls eine leichte Hochregulation bereits während der Epileptogenese. Nach 97 Tagen war die Expression in der Kontrollgruppe (Gruppe 22), jedoch nicht in der VHC-stimulierten Gruppe (Gruppe 10) verglichen mit den Werten nach 14 Tagen (Gruppe 11 und 23) hochreguliert.

In hippokampalem Gewebe von TLE-Patienten wurde eine Herunterregulation verglichen mit Autopsiekontroll-Gewebe gemessen (McKiernan et al., 2012), was den Daten aus den Tierversuchen widerspricht.

Die Daten könnten so interpretiert werden, dass die möglicherweise pathologische Hochregulation der miRNA-433-3p in der chronischen Phase der Epilepsie durch die VHC-DBS verhindert wurde.

Es wurde gezeigt, dass miRNA-433-3p die Zelldifferenzierung in Osteoblasten durch die Herunterregulation von Dickkopf-1 induziert (Tang et al., 2017). Dickkopf-1 ist ein Inhibitor des Wnt-Signalwegs. Die Hemmung dieses Signalwegs kann exzitotoxischen und ischämischen Zelltod induzieren. Im Epilepsiemodell (systemisch-injiziertes KA) wurde gezeigt, dass Ratten, bei denen Anfälle keinen Neuronenverlust induzierten, kein Dickkopf-1 exprimierten, wohingegen Ratten mit ausgeprägtem Neuronenverlust Dickkopf-1 exprimierten, was mit einem verminderten  $\beta$ -Catenin-Level einherging.  $\beta$ -Catenin ist ein Schlüsselprotein des Wnt-Signalwegs. Die intracerebroventrikuläre Injektion von Dickkopf-1-Antisense-Oligonukleotid reduzierte den anfallsinduzierten Neuronenverlust, das Auftreten von

Anfällen wurde allerdings nicht beeinflusst. Daher wurde vermutet, dass die Aufrechterhaltung des Wnt-Signalwegs, z. B. durch Antagonisierung endogener Wnt-Inhibitoren, die Ausbildung einer HS verhindern könnte (Busceti et al., 2007).

➤ miRNA-431:

Für diese miRNA wurde eine Hochregulation in der früheren Latenzphase im Pilocarpin-Modell gefunden, welche in der späten Latenzphase nicht mehr zu messen war (Roncon et al., 2015). Eine Hochregulation der mmu-miRNA-431-5p, welche eine identische Sequenz wie die rno-miRNA-431 hat, wurde in Mäusen ebenfalls während der Latenzphase im Pilocarpin-Modell (Kretschmann et al., 2014) und nach systemisch injiziertem KA (Schouten et al., 2016) gemessen. Unsere Daten zeigen ebenfalls eine Hochregulation in der frühen Latenzphase. Außerdem haben wir eine Hochregulation in der chronischen Phase gemessen, welche durch VHC-DBS unterdrückt wurde. Die Expression dieser mRNA war vergleichsweise gering (200 bis 600 rpm), weswegen nicht von einem starken Effekt auf Ziel-Gene ausgegangen werden kann.

In einem Neuronenkulturmodell für M. Alzheimer (kortiko-hippokampale Neuronen von „triple transgenic“ 3xTg-AD-Mäusen) wurde gezeigt, dass die Hochregulation von miRNA-431 über den Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg den Amyloid- $\beta$ -induzierten Verlust von Synapsen verhindern kann (Ross et al., 2018). Der Wnt-Antagonist Dickkopf-1 und dessen transmembran-Rezeptor Kremen-1 inhibieren nach Akkumulation den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg, was zum Synapsenverlust führt. Kremen-1 ist ein Ziel der miRNA-431, wodurch die Hochregulation dieser miRNA den Synapsenverlust verhindern könnte.

In einem Epilepsiemodell (Ratte, systemisch injiziertes KA) wurde gezeigt, dass in der Epileptogenese-phase  $\beta$ -Catenin, Wnt3a und Cyclin D1, welche wichtige Proteine des Wnt-Signalwegs sind, hochreguliert waren. Außerdem führte ein Knockdown von  $\beta$ -Catenin zur Unterdrückung verstärkter Neurogenese (Qu et al., 2017). Eine Hochregulation der miRNA-431 könnte also zu verstärkter Neurogenese und so zur Entstehung pathologischer Netzwerke führen. Eine VHC-stimulationsinduzierte Unterdrückung dieser Regulation, wie sie in unseren Daten gemessen wurde, könnte dies verhindern.

➤ miRNA-410-3p:

Für miRNA-410-3p wurde bereits eine signifikante Hochregulation bei manifester Epilepsie nach Pilocarpin-induziertem SE gemessen (Roncon et al., 2015). Unsere

Daten zeigen ebenfalls eine Hochregulation in der manifesten Epilepsie. Insgesamt war diese miRNA mit 3500 bis 7000 rpm stark exprimiert, was einen hohen Einfluss auf die Targets vermuten lässt. Allerdings wurde in den Daten des EpimiRNA-Epileptogenese-Projektes eine leichte Herunterregulation während der späten Epileptogenese und 24 h sowie einen Monat nach dem ersten Anfall gemessen. Ein eindeutiger Schluss über die Rolle dieser miRNA während der Epileptogenese und in der chronischen Epilepsie lässt sich aus diesen Beobachtungen nicht ziehen.

Unsere Ergebnisse der miRNA-Sequenzierung des PPS Modells stimmen in vielen Punkten mit bisherigen Studien überein, zeigen jedoch auch einige Abweichungen in der Richtung der Regulation. Abweichungen sind vermutlich größtenteils dadurch begründet, dass sich Mechanismen der Epileptogenese in unterschiedlichen Tiermodellen voneinander unterscheiden. Eine mRNA-Sequenzierungsstudie, die vier verschiedene Tiermodelle (systemisch injiziertes Pilocarpin, systemisch injiziertes KA, selbsterhaltender SE durch elektrische Stimulation, Amygdala-Kindling) verglichen hat, zeigte eine geringe Überschneidung der regulierten mRNAs (Dingledine et al., 2017), was auf unterschiedliche Mechanismen der Epileptogenese in den Modellen schließen lässt. Dies könnte auch zu verschiedenen Effekten der DBS in den unterschiedlichen Modellen führen und unterstreicht die Bedeutung der Auswahl eines Tiermodells, das möglichst viele relevante Merkmale der Zielerkrankung repliziert.

#### 5.4. Mögliche miRNA-gesteuerte Mechanismen der antiepileptogenen VHC-DBS

Anhand der bisher vorhandenen Kenntnisse über mRNA-miRNA-Interaktionen und mittels verschiedener Algorithmen, die durch Sequenzvergleiche Wahrscheinlichkeiten für die Bindung einer miRNA an eine mRNA vorhersagen, wurde eine Vielzahl an möglichen Zielgenen der regulierten miRNAs identifiziert. Da miRNAs mit imperfekt komplementären Sequenzen an mRNAs binden und diese regulieren können, und außerdem eine mRNA mehrere miRNA-Bindesequenzen haben kann, kann eine miRNA potentiell hunderte unterschiedlicher mRNAs regulieren und umgekehrt kann eine mRNA von verschiedenen miRNAs reguliert werden. Daher können evidenzbasierte Nachweise durch vorherige Studien mittels PCR, Western Blot oder Reporterassays zwar einen Anhaltspunkt für mögliche Interaktionen geben; ob eine Regulation der mRNA aber tatsächlich in dem untersuchten Gewebe stattgefunden hat, kann anhand dieser Parameter nicht eindeutig festgestellt werden. Die vorhergesagten MTI erlauben außerdem keine Aussage über die Colokalisation von miRNAs und mRNAs. Ob eine vorhergesagte Interaktion tatsächlich im Hippokampus möglich ist, hängt davon ab, ob miRNA und mRNA in der gleichen Zelle exprimiert sind. Da anhand unserer Daten eine

sehr große Anzahl an potentiell regulierten mRNAs in Frage kamen, wurden solche näher betrachtet, die eine starke Evidenz und/oder einen hohen PScore aufgrund der Sequenzkomplementarität haben oder die von mehreren der als relevant identifizierten miRNAs als Ziele vorausgesagt wurden. Mittels qPCR wurde 97 Tage nach PPS eine Hochregulation der mRNAs von GRB2, AZIN1, MAPK8 und KRAS in VHC-stimulierten Ratten verglichen mit PPS stimulierten Ratten ohne DBS (Gruppe 10 gegen Gruppe 22) gemessen. Zwei dieser mRNAs (GRB2 und KRAS) waren mit starker Evidenz für eine Interaktion beim Menschen nachgewiesen worden, für AZIN1 wurde in Mäusen eine evidenzbasierte Interaktion mit miRNA-433-3p nachgewiesen. GRB2 und AZIN1 hatten außerdem positive PScores. KRAS hatte zusätzlich einen evidenzbasierten MTI für die Interaktion mit miRNA-487b-3p, welche ein ähnliches Expressionsmuster wie die miRNA-433-3p aufwies. MAPK8 war die mRNA mit dem höchsten kombinierten PScore (2,37) für miRNA-433-3p. Die Regulation dieser vier potentiellen Ziele der miRNA-433-3p war also entgegengesetzt zur Herunterregulation der miRNA-433-3p in den VHC-stimulierten Ratten, was eine mögliche Interaktion der miRNA-433-3p und dieser Ziele bestätigt. Die Daten legen nahe, dass eine pathologische Hochregulation der miRNA-433-3p durch die VHC-DBS verhindert wurde, was unter anderem die Herunterregulation der genannten mRNAs verhindern könnte. Bisherige relevante Veröffentlichungen zu diesen möglichen Zielen der miRNA-433-3p im Zusammenhang mit Epilepsie oder mit der miRNA-433-3p sind im folgenden Absatz zusammengefasst:

➤ GRB2:

Die Interaktion von hsa-miRNA-433-3p und GRB2 wurde mittels Western Blot Analysen und Luziferase-Assay nachgewiesen (Luo et al., 2009). GRB2 war im Tiermodell nach Elektrokrampftherapie zur Depressionsbehandlung im Hippokampus hochreguliert (Newton et al., 2004). In einem Maus-Alzheimermodell wurde gezeigt, dass GRB2 über Interaktion mit NOX4 (NADPH-Oxidase 4) und die Reduktion der Aktivität von Stickoxiden das Zytoskelett stabilisiert und so Neurodegeneration vermindert (Majumder et al., 2017). Eine miRNA-433-3p-vermittelte Herunterregulation könnte daher zu vermehrter Neurodegeneration führen, was durch die unterdrückte Hochregulation der miRNA-433-3p nach VHC-Stimulation verhindert worden sein könnte.

➤ AZIN1:

Es wurden keine Publikationen gefunden, die einen Zusammenhang zwischen AZIN1 und Epilepsie beschreiben. Eine starke Evidenz für die Interaktion von

miRNA-433-3p und AZIN1 ist in Li et al. (2013) beschrieben. Dort wurde die Regulation von AZIN1 mittels qPCR in der Niere von Mäusen untersucht. Außerdem wurde hier eine Regulation des TGF- $\beta$ /Smad3-Azin1-Signalwegs durch miRNA-433-3p beschrieben. In einer weiteren Publikation wurde eine Interaktion von miRNA-433-3p und AZIN1 mittels *in vitro* Assay und anhand von Western Blots nachgewiesen. Außerdem wurde hier gezeigt, dass eine reduzierte AZIN1-Expression zur Aktivierung von TGF- $\beta$ 1 führt (Tao et al., 2016).

TGF- $\beta$  ist in Vorgänge wie Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Migration involviert. Außerdem wurde der TGF- $\beta$ -Signalweg als Inhibitor der Neuroinflammation identifiziert (Cekanaviciute et al., 2014; Pál et al., 2014). Die Öffnung der BBB führt zu erhöhter Albumin-Penetration ins Hirngewebe. Diese erhöhte Albuminkonzentration führt zur Vermehrung exzitatorischer Synapsen sowie zur Synchronisierung neuronaler Aktivität (Weissberg et al., 2015). Ein möglicher Mechanismus dieses Effekts ist die Astrozyten-vermittelte Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalwegs (Webster et al., 2017). Die Albumin-induzierte Wirkung von TGF- $\beta$  im Tiermodell hatte proiktogene Effekte und induzierte erhöhte neuronale Erregbarkeit (Frigerio et al., 2012).

Eine miRNA-433-3p-induzierte Herunterregulation von AZIN1, wie sie in unseren Daten vorhergesagt und mittels qPCR validiert wurde, könnte über Aktivierung der TGF- $\beta$ -Signalwegs eine proepileptogene Wirkung haben, wodurch die VHC-stimulationsinduzierte Unterdrückung dieses Mechanismus antiepileptogen wirken könnte.

➤ KRAS:

Zum Auftreten von Epilepsien bei Mutationen des KRAS-Gens liegen mehrere Fallberichte vor. Bei Patienten mit Linearem Naevus-sebaceus-Syndrom (LNSS), einer Phakomatose, die mit Naevus sebaceus, Intelligenzminderung und Epilepsie einhergeht, wurden sowohl heterozygote (Wang et al., 2015) als auch somatische Mosaikmutationen (Lihua et al., 2017) von KRAS beschrieben. Auch bei Patienten mit kardio-fazio-kutanem Syndrom (CFC), die unter schwer behandelbaren infantilen Epilepsieformen (West-Syndrom, Lennox Gastaut-Syndrom) litten, wurden Mutationen unter anderem im KRAS-Gen detektiert (Søvik et al., 2009). Eine Interaktion von KRAS und hsa-miRNA-433-3p wurde mittels Luziferase-Assay nachgewiesen (Guo et al., 2013). Die Interaktion von KRAS und miRNA-487b-3p, welche in unseren Daten ein ähnliches Expressionsmuster wie die miRNA-433-3p aufwies, wurde ebenfalls durch Luziferase-Assays belegt (Hata et al., 2017). Das könnte bedeuten, dass die



Herunterregulation der mRNA des KRAS-Gens, durch z. B. eine heterozygote Mutation, die Epileptogenese begünstigt. In unseren Daten könnte diese Regulation durch eine Hochregulation der miRNA-433-3p gesteuert worden sein, welche durch die VHC-DBS unterdrückt wurde.

➤ MAPK8:

Die Familie der MAPK ist in zahlreichen Studien in Verbindung mit Epilepsie untersucht worden, wie im folgenden Absatz näher beschrieben ist. Ein Zusammenhang der Epileptogenese mit der MAPK8, welche auch als JNK1 (c-Jun-N-terminal kinase 1) bekannt ist, wurde ebenfalls beschrieben. Im Epilepsiemodell (systemisch-injiziertes KA) bei JNK1-Knockout Mäusen wurde reduzierte Neurodegeneration sowie eine verminderte Aktivierung von Gliazellen und niedrigere Expression der mRNAs von Proteinen, die in Entzündungsreaktionen involviert sind (monocyte chemoattractant protein-1 und cyclooxygenase-2), verglichen mit KA behandelten Wildtyp-Mäusen gezeigt (de Lemos et al., 2018). Im gleichen Modell wurde nachgewiesen, dass die Inhibition von JNK1 mittels Licochalcone-A Anfälle reduzierte (anhand anfallsbezogenem Verhalten evaluiert, kein EEG) und die Expression des Apoptosemarkers Anti-B-cell lymphoma (BCL)-2 verminderte (Busquets et al., 2018). Als Mechanismus wurde hier außerdem die JNK1 induzierte Reduktion Calcium-abhängiger Enzyme wie dem „ionized calcium-binding adapter molecule 1“ (IBA1) vorgeschlagen.

Es zeigte sich, dass alle 5 der oben genannten miRNAs, die bei der Clusteranalyse das in Abb. 24 O gezeigte Expressionsmuster aufwiesen, mRNAs des MAPK-Signalweg als mögliche Ziele haben. Der Ras/MAPK-Signalweg ist involviert in Prozesse wie zelluläre Proliferation, Differentiation, Zell-Zyklus Regulation, Zell-Überleben und Metabolismus (Cargnello und Roux, 2011). Der MAPK-Signalweg wurde bereits in verschiedenen Veröffentlichungen (Gorter et al., 2014; Hu et al., 2011) als wichtiger Signalweg identifiziert, welcher einige der Ziele von miRNAs beinhaltet, die in der chronischen Phase der mTLE nach elektrisch induziertem SE im Hippokampus hochreguliert waren. Es gibt verschiedene Epilepsiesyndrome, die auf Änderungen des Ras/MAPK-Signalwegs zurückzuführen sind, wie das CFC-Syndrom, das Costello-Syndrom und das Noonan-Syndrom (Cao et al., 2017). Außerdem ist er an der Entstehung verschiedener neurologischer Krankheiten wie M. Parkinson und M. Alzheimer beteiligt (Kim und Choi, 2015).

Zu dem hier verwendeten Modell (30-30-8-PPS, Ratte) gibt es bereits Daten, die das Transkriptom des DG in der Epileptogenese (15 Tage nach der 8 h-PPS) beschreiben. Eine große Anzahl an differentiell exprimierten mRNAs in dieser Studie war in die Immunantwort involviert. Außerdem wurden regulierte mRNAs im Zusammenhang mit dem Calcium-Signalweg, Axon Guidance und synaptischen Funktionen identifiziert (Vieira et al., 2016). Unsere Analyse der miRNAs, die 14 Tage nach PPS im Hippokampus reguliert waren, zeigte einen möglichen Einfluss auf die Calcium-Reabsorption. Sowohl Calcium-Signalwege als auch Calcium-Transportmechanismen wurden bereits von Vieira et al. (2016) als relevante Signalwege der Epileptogenese im 30-30-8h-PPS Modell identifiziert. Die Calcium-Reabsorption wurde in der Signalweganalyse der, in unseren Daten direkt nach DBS regulierten miRNAs, unter anderem durch die Interaktion mit den Calcium-Pumpen Atp2b1 und Atp1b3 identifiziert. Diese wurden als Ziele der let-7a-1-3p und let-7d-5p vorhergesagt, welche in unseren Daten direkt nach der DBS in den stimulierten Ratten hochreguliert waren. Für die Calcium-Pumpe Atp2b4 wurde bereits ein Zusammenhang mit miRNA-regulierten Mechanismen in der Epileptogenese beschrieben (Rajman et al., 2017). Dabei wurde diese als Ziel der miRNA-129-5p ausgemacht. Eine Hochregulation der miRNA-129-5p führte zu verminderter Atp2b4-Expression und induzierte synaptisches Downscaling. Das Aufrechterhalten der Atp2b4-Konzentration verhinderte das synaptische Downscaling.

Die direkt nach der VHC-DBS signifikant regulierten miRNAs zeigten außerdem eine hohe Wahrscheinlichkeit eines Einflusses auf den Fettsäureabbau. Die Hemmung des Fettsäureabbaus könnte im Zusammenhang der Wirkmechanismen einer Ketogenen Diät eine Rolle in der antiepileptogenen Wirkung der DBS spielen. Eine Ketogene Diät zielt auf eine Energieversorgung durch Fette anstelle von Kohlenhydraten ab. Die Wirkmechanismen der Ketogenen Diät sind allerdings bislang nicht gänzlich bekannt. Der Fettsäureabbau wurde laut unserer Analyse sowohl von miRNAs beeinflusst, die durch VHC-DBS herunterreguliert waren, als auch durch hochregulierte miRNAs. Die Auswirkungen auf den Fettsäureabbau sind anhand unserer Daten also nicht absehbar.

Neben den beschriebenen Daten zur miRNA-Regulation in Tiermodellen liegt eine aktuelle Studie zur Regulation von miRNAs im menschlichen Hippokampus bei mTLE-HS-Patienten vor (Bencurova et al., 2017). MiRNA-150-5p und miRNA-129-2-3p waren in der genannten Studie in Übereinstimmung mit den Befunden der vorliegenden Arbeit signifikant hochreguliert. Die Hochregulation dieser miRNAs wurde in unseren Daten durch VHC-Stimulation unterdrückt. Dasselbe gilt für hsa-miRNA-191-5p sowie rno-miRNA-191a-5p, welche identische Sequenzen aufweisen. Die anderen 19 miRNAs, die

im Hippokampus der mTLE-Patienten herunterreguliert waren (Bencurova et al., 2017) waren in den hier analysierten Rattenhippokampi nicht signifikant reguliert.

## 5.5. Stärken und Limitationen der verwendeten Methoden

Die wesentlichen Merkmale der mTLE-HS sind:

1. Häufig initiales auslösendes Ereignis (z. B. komplizierte Fieberkrämpfe, Schädel-Hirn-Trauma, Hypoxie oder Meningoenzephalitis (French et al., 1993; Wieser und ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy, 2004).
2. Anschließende Latenzperiode ohne klinische Symptome (Dauer beim Menschen typischerweise 10-15 % der Lebenszeit (French et al., 1993).
3. Anschließend spontane Anfälle typischer Semiologie (epigastrische und psychische Auren, automotorische Anfälle, sekundär generalisierte tonisch-klonische Anfälle)
4. Anfallsfrequenz typischerweise 2-30/Monat (French et al., 1993)
5. Interiktale epilepsietypische Potentiale im Hippokampus (Williamson et al., 1993).
6. Anfallsursprung im Hippokampus (Williamson et al., 1993)
7. HS, am häufigsten (70 %) Typ 1 nach ILAE mit Neuronenverlust in CA1 und Hilus des DG > CA3, Aussparung von CA2 (Blümcke et al., 2013).
8. Häufig progressiver Verlauf (Wieser und ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy, 2004).
9. Häufige Pharmakoresistenz (Semah et al., 1998; Wieser und ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy, 2004).
10. Gutes Outcome nach Epilepsiechirurgie (Wieser und ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy, 2004).

Das einzige dieser 10 Merkmale, das die mTLE-HS sicher von anderen Epilepsieformen unterscheidet, ist das Auftreten der Hippokampussklerose (Nr. 7). Dieses Merkmal ist daher notwendige Voraussetzung, um ein mTLE-HS-Modell als valide zu betrachten.

Das 30-30-8-PPS Modell repliziert eine HS Typ 1 nach ILAE (Norwood et al., 2010). Die meisten Tiermodelle fokaler, erworbener Epilepsien führen dagegen nicht zu einer HS.

Die systemische Applikation von Chemokonvulsiva wie KA verursacht ausgedehnte Hirnschädigungen, die extrahippokampal betont sind (Schwob et al., 1980; Sloviter and Bumanglag, 2013). Kindling geht nur mit minimalen Gewebsveränderungen einher (Morimoto et al., 2004). Ein Post-SE-Modell durch einmalige 3stündige PPS in der Ratte zeigt einen Neuronenverlust, der auf den Hilus des DG beschränkt ist (Norwood et al., 2010). Einschränkend ist zu erwähnen, dass im 30-30-8-PPS Modell der PP beidseitig stimuliert und damit eine beidseitige HS induziert wird, während diese beim Menschen meist unilateral vorhanden ist. Auch eine einseitige Stimulation führt allerdings bei der Ratte zu bilateraler hippocampaler Schädigung, da im Gegensatz zum Menschen ausgedehnte kommissurale Verbindungen der beiden Hippokampi bestehen (Gottlieb und Cowan, 1973). Durch die beidseitige Stimulation verdoppelt sich nebenbei die Anzahl der für weitere Untersuchungen zu Verfügung stehenden Gewebeproben.

Die Dauer der Latenzperiode (2) ist von entscheidender Bedeutung für die Untersuchung und Beeinflussung der Epileptogenese. Im 30-30-8-PPS Modell beträgt die Dauer  $23 \pm 11$  Tage, was ca. 1-3 „Menschenjahren“ entspricht (Sengupta, 2013). Die Dauer der Latenzperiode beim Menschen beträgt im Mittel 7,5 Jahre (French et al., 1993) und liegt somit zumindest in derselben Größenordnung wie im 30-30-8-PPS Modell. Die Latenzdauer nach intraamygdalärer KA-Injektion beträgt dagegen bei der Maus nur etwa 2 Tage (Mouri et al., 2008) und erlaubt keine länger dauernden Interventionen. Nach systemischer Pilocarpin-Injektion bei der Ratte ist die Latenzperiode sehr variabel und dauert teilweise nur 1 Woche (Pitkänen et al., 2017).

Von den übrigen genannten Merkmalen der mTLE-HS werden im 30-30-8-PPS Modell auch das Vorhandensein eines initialen auslösenden Ereignisses (1), die Größenordnung der Anfallsfrequenz (4), die interiktalen epilepsietypischen Potentiale (5), der hippocampale Anfallsursprung (6) und der progressive Verlauf (8, vgl. Abb. 17) modelliert. Pharmakoresistenz (9) und Outcome nach Epilepsiechirurgie (10) sind nicht untersucht.

Insgesamt repliziert das 30-30-8-PPS Modell somit die meisten Merkmale der mTLE-HS und ist hierin insbesondere den übrigen Nagermodellen überlegen. Ein weiterer Vorteil des Modells ist die geringe Mortalität (Bumanglag and Sloviter, 2008).

Die Einschränkungen des Modells sind im Wesentlichen praktischer Natur und umfassen den hohen Arbeitsaufwand im Vergleich zu chemokonvulsiven Modellen und den geringen Durchsatz wegen der langen Latenzperiode und der relativ niedrigen Anfallsfrequenz. Aus den zuletzt genannten Gründen sind Screeninguntersuchungen mit dem 30-30-8-PPS Modell schwierig durchzuführen. Außerdem ist eine vollständige

visuelle EEG-Auswertung durch den Untersucher erforderlich, da automatisierte Methoden hierfür nicht sensitiv genug sind und wegen der großen Intervalle zwischen den Anfällen die sichere Erkennung des ersten spontanen Anfalls für die exakte Bestimmung der Dauer der Latenzperiode unabdingbar ist.

Die Validität des Modells muss offensichtlich Vorrang vor der Möglichkeit haben, sehr hohe Tierzahlen in kurzer Zeit und mit wenig Aufwand durchzusetzen. Hieraus ergibt sich allerdings die Limitierung, dass mit üblichen Labormitteln keine Validierungsstudien mit hohen Gruppengrößen durchführbar sind. Daher enthalten mehrere Gruppen nur geringe Tierzahlen, z. B. wenn bereits nach kurzer Zeit absehbar war, dass die DBS wahrscheinlich keinen deutlich positiven Effekt auf die Latenzperiode oder die Anfallsfrequenz erbringen würde. Die Ergebnisse sind daher als explorativ zu betrachten.

Ein SE kann zu starken Varianzen der Ausprägung der Hirnschädigung zwischen den Versuchstieren führen, wie bereits unter Absatz 2.3 beschrieben. In dem hier verwendeten Tiermodell wird die Ausbildung eines konvulsiven SE mittels Präkonditionierung vermieden. Es kommt lediglich zu der Ausbildung eines fokalen, nicht-konvulsiven SE, wodurch die Hirnschädigung weniger ausgebreitet und weniger variabel ist.

Die meisten Antikonvulsiva wirken ausschließlich symptomatisch, indem sie Anfälle unterdrücken. Eine Veränderung des Krankheitsbildes wird nur bei wenigen Medikamenten vermutet und ist auch dort nicht eindeutig nachgewiesen. Daher wäre eine Behandlung, die einen krankheitsmodifizierenden Effekt mit sich bringt, eine vielversprechende Option für mTLE-Patienten. Eine lange Latenzperiode sowie niedrige Variabilität der Hirnschädigung in dem beschriebenen PPS Modell, machen dieses Modell besonders geeignet für die Untersuchung antiepileptogener und krankheitsmodifizierender Effekte (Löscher und Brandt, 2010).

Neben Speziesunterschieden können auch methodische Differenzen die eingeschränkte Übereinstimmung im Vergleich mit anderen beschriebenen Tierversuchen erklären, da in der vorliegenden Arbeit die miRNA-Sequenzierung nach Ago2-Fällung erfolgte und somit ausschließlich inhibitions-kompetente miRNAs identifizierte. Inwiefern tierexperimentelle Daten mit Daten aus menschlichen Gewebe vergleichbar sind, ist in Absatz 5.7 beschrieben.

Zur Analyse möglicher involvierter Signalwege wurde die DIANA-miRPath v3.0 Software verwendet (Vlachos et al., 2015). Für die Signalweganalyse wurde der microT-CDS Algorithmus verwendet, welcher auch kodierende Sequenzen von mRNAs in der

Analyse berücksichtigt. Dieser ist allerdings weniger stringent als der TargetScan-Algorithmus der DIANA Tool Software (Vlachos et al., 2015) und kann so zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Dieser Algorithmus wurde hier genutzt, da durch Verwendung des TargetScan-Algorithmus nur Signalweg-Vorhersagen aufgrund der Interaktion mit einzelnen miRNAs (miRNA-431 oder miRNA-433-3p) der 5 analysierten miRNAs aus Abbildung 24 angegeben wurden. Bei der Analyse der 8 akut regulierten miRNAs basierte die Vorhersage regulierter Signalwege mit dem TargetScan-Algorithmus auf der Regulation von nur 3 (let-7b-5p, let-7e-5p, let-7d-5p) der 8 miRNAs. Um eine Signalweganalyse basierend auf Interaktionen mit möglichst vielen der als relevant identifizierten miRNAs darzustellen, wurde der microT-CDS Algorithmus verwendet.

Die in Tabelle 10 beschriebenen möglichen Mechanismen der DBS, die in anderen Tierversuchen identifiziert wurden, sind in unserer Signalweg-Analyse nicht identifiziert worden. Das kann einerseits an der Vielzahl möglicher regulierter mRNAs liegen, wodurch bei Anwendung unterschiedlicher Analysemethoden verschiedene Signalwege als signifikant reguliert gefunden werden. Außerdem kann die Verwendung unterschiedlicher Modelle zur Identifizierung anderer Signalwege führen.

Ein Nachteil der Signalweganalyse mittels DIANA Tool als auch mittels MTI Validierung liegt darin, dass auch miRNAs einbezogen werden, deren Expression in Hirngewebe nicht belegt ist. Daher sind möglicherweise auch Mechanismen und Interaktionen angegeben, die für die Epileptogenese keine Relevanz haben, da die angegebenen Ziele im Gehirn nicht exprimiert werden. Für die vier untersuchten mRNAs wurde eine Expression im Gehirn nachgewiesen (Cheng und Nussinov, 2018; Fernandes et al., 2017; Luttrell und Miller, 2013; Majumder et al., 2017). Weiterhin wurde bisher keine zellspezifische Expression in den Analysen berücksichtigt.

## 5.6. Mögliche Gründe für Abweichungen innerhalb einer Gruppe

Ähnlich wie beim Menschen besteht auch im 30-30-8-PPS Modell der mTLE-HS eine deutliche Varianz in der Latenzzeit und der Anfallsfrequenz, wodurch die Detektion signifikanter Differenzen zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen erschwert wurde. Vor Versuchsbeginn erfolgte daher eine Fallzahlberechnung. Bei einigen Ratten fand sich (ebenfalls analog zum Verlauf der mTLE-HS bei manchen Patienten) eine Zunahme der Anfallsfrequenz mit der Zeit. Deshalb war es wichtig, eine Mindestdauer der Ableitung nach dem ersten Anfall festzulegen, ab der die Ratten in die Auswertung aufgenommen wurden. Diese wurde auf 30 Tage festgelegt. Ratten, die vor Ablauf dieser

30 Tage nach dem ersten Anfall ihr Elektrodenkap verloren oder bei denen aus anderen Gründen (z. B. Defekt des implantierten Transmitters) keine EEG-Aufzeichnung mehr möglich war, wurden aus der Auswertung der Anfallsfrequenz ausgeschlossen.

Kritische Schritte im Versuchsablauf, deren Variation zu Abweichungen der Zielparameter führen kann, umfassen:

➤ Elektrodenposition:

Die AP- und ML- Positionierung der Elektroden wurde durch Orientierung anhand der Hirnnähte Bregma und Lambda sowie der Mittellinie durchgeführt, deren Position bei den Tieren eine gewisse Varianz aufweist (Blasiak et al., 2010). Kleine Unterschiede in der Elektrodenposition zwischen den Versuchstieren mit Einfluss auf die klinischen Outcome-Parameter können daher nicht vollständig ausgeschlossen werden. Allerdings sind gravierende Fehllagen der Elektroden durch Verwendung eines stereotaktischen Rahmens und insbesondere durch die Ableitung evozierter Potentiale äußerst unwahrscheinlich.

➤ Abstand zwischen den Elektrodenenden:

Die Stimulationselektroden wurden durch Verdrillen mittels einer Klemme mit einem Abstand von 1 mm zwischen den beiden Elektroden spitzen hergestellt. Beim Absenken der Elektroden ins Gehirn kann es allerdings sein, dass sich die Elektrodenenden leicht aufeinander zu oder voneinander weg bewegen. Der Abstand zwischen den Elektroden spitzen hängt antiproportional mit der Stromstärke zusammen, die bei einer konstanten Spannung fließt ( $I=U/R$ ). Obwohl bei allen Tieren während der PPS Anfälle und entsprechende Anfallsmuster im EEG auftraten, sind gewisse Unterschiede in der Effizienz der Stimulation mit entsprechendem Einfluss auf die Epileptogenese denkbar.

➤ Zeit zwischen den Stimulationen:

Die 30 min-Stimulationen sowie die 8 h-Stimulation wurden meist am Morgen zwischen 6 und 9 Uhr gestartet. Mussten mehrere 30 min-Stimulationen an einem Tag durchgeführt werden, kam es allerdings zu Abweichungen dieser Uhrzeiten, wodurch der Abstand zwischen den Stimulationen teilweise variierte. Es ist bislang nicht bekannt, ob der genaue Zeitabstand der Stimulationen einen Einfluss auf den Verlauf der Epileptogenese hat.

➤ Ausmaß der Verletzung des Gehirns durch die Operation:

Ein weiterer Punkt, der die Häufigkeit und das erste Auftreten von Anfällen beeinflussen könnte, ist das Ausmaß der Verletzungen, die bei der Elektroden-Implantation entstehen. Bei einigen Ratten mussten die Elektroden (z. B. wegen defekter Isolierung) intraoperativ ausgetauscht werden, bevor eine optimale Positionierung erreicht wurde. Dieses mehrfache Absenken von Elektroden könnte eine zusätzliche Verletzung des Gehirns bedeuten. Weiterhin erhielten manche Versuchstiere mehr Stimulationselektroden als andere (FF/DG: 4 Stimulationselektroden, VHC: 3 Stimulationselektroden, PP: 2 Stimulationselektroden). Dies wurde durch die Implantation von FF- oder VHC-Elektroden bei Kontrolltieren berücksichtigt; allerdings wurde für die DG-stimulierten Ratten keine eigene Kontrollgruppe erstellt, da hier nicht von einer Läsion in einer zusätzlichen Struktur des Papez-Kreises auszugehen war und daher die PP-Kontrollgruppe zum Vergleich herangezogen wurde. Eine zusätzliche Schädigung des Gehirns könnte eine höhere Anfallsfrequenz hervorrufen. Andererseits könnte eine durch Elektrodenimplantation verursachte Mikroläsion aber auch antiepileptogene Effekte haben. Als Surrogatparameter hierfür wurde das Auftreten akut symptomatischer Anfälle herangezogen. Eine Korrelation zwischen dem Auftreten akut symptomatischer Anfälle und der Anzahl implantierter Elektroden oder dem späteren Auftreten spontaner Anfälle wurde nicht festgestellt. Allerdings wurde im Falle der VHC-Kontrollgruppe eine, im Vergleich zu den Kontrollen ohne VHC-Elektroden erhöhte Anfallsfrequenz festgestellt, was vermutlich auf die Implantation der zusätzlichen VHC-Elektroden zurückzuführen ist. Dieses Phänomen wurde schon in früheren Studien berichtet, so wurde z. B. ein „Prokindling“-Effekt durch Elektrodenimplantation gezeigt, welcher sich durch erhöhte Anfälligkeit für späteres Kindling sowie epileptoforme Feldpotentiale im Hippokampus zeigte (Löscher et al., 1995). Es wurde weiterhin vermutet, dass die Implantation von Elektroden in sensitive Hirnregionen zu Epileptogenese-Vorgängen wie nach einem Hirntrauma führen kann (Löscher, 2002). In den hier beschriebenen Versuchen kann diese Tatsache zu Abweichungen zwischen den Ratten sowohl innerhalb einer Gruppe (z. B. durch Replatzierung einer Elektrode während der OP), sowie zwischen den Gruppen (unterschiedliche Anzahl an Elektroden) geführt haben.

➤ Dauer der Stimulation während der Elektrodenimplantation:

Während der Implantation wurde eine Stimulation mit 0,5 Hz und 20 V durchgeführt, um evozierte Potentiale im DG ableiten zu können. Diese



Stimulation ist niedrigfrequent und wurde möglichst kurz durchgeführt. Ein Effekt dieser Stimulation auf den Verlauf der Epileptogenese ist nicht auszuschließen; allerdings erscheint im Fall der PPS das Ausmaß der intraoperativen Stimulation im Vergleich zur späteren 30-30-8-PPS vernachlässigbar. Dagegen ist im Falle der VHC- und FF-Elektroden ein möglicher Effekt schwer einschätzbar, da die Langzeitstimulation dieser Hirnareale mit sehr geringer Spannung (0,1 bis 2 V) erfolgte, während intraoperativ eine Spannung von 10 V zum Evozieren von Potentialen erforderlich war.

➤ Anzahl/Dauer der Narkosen:

Die Ratten wurden während der Operation, Injektionen und Behandlungen wie Reimplantation des Transmitters mittels Isofluran narkotisiert. Ein antiepileptogener Effekt von Isofluran wurde kürzlich in zwei Rattenmodellen (intrahippokampales KA und systemisch injiziertes Paraoxon) nachgewiesen (Bar-Klein et al., 2016). Die Anzahl und Dauer der Narkosen wurde zwischen den Versuchstieren möglichst konstant gehalten, allerdings kam es vor, dass Ratten zur Reimplantation des Transmitters zusätzliche Narkosen erhielten. Dies wurde dokumentiert und hinsichtlich eines möglichen Effekts untersucht. Unter den Ratten, die zusätzliche Narkosen erhalten hatten, waren sowohl Ratten, die viele spontane Anfälle entwickelten, als auch Ratten, die keine spontanen Anfälle bekamen. Ein Effekt der Narkosen auf das Auftreten spontaner Anfälle wurde also nicht beobachtet, allerdings kann ein solcher im Einzelfall nicht ausgeschlossen werden, da er von unbekannten Faktoren, wie dem Verlauf der Epileptogenese zum Zeitpunkt der Narkose abhängen könnte. Eine statistische Auswertung ist aufgrund der unterschiedlichen Zeitpunkte der zusätzlichen Narkosen sowie unterschiedlicher Behandlung der betroffenen Ratten nicht möglich und müsste in einem separaten Versuch geklärt werden.

Weitere Faktoren, die auch bei gleicher Behandlungen zu Varianzen zwischen den Versuchstieren geführt haben können, sind im Folgenden beschrieben:

➤ Akut symptomatische Anfälle:

Einige Ratten hatten akut symptomatische Anfälle nach der Elektroden-Implantation oder nach der PPS. Diese akut symptomatischen Anfälle könnten theoretisch die Epileptogenese beeinflussen. Eine Korrelation zwischen dem Auftreten von akut symptomatischen Anfällen und der Latenzperiode oder Anfallsfrequenz wurde nicht gefunden.

➤ „Non-Responder“:

In verschiedenen Studien zur Wirksamkeit von Antikonvulsiva wurde festgestellt, dass einige Tiere trotz gleicher Behandlung nicht auf das getestete AED reagierten (Bethmann et al., 2007; Brandt et al., 2004; Volk et al., 2006). Solche „Non-Responder“ können zu großen Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen führen.

➤ Unterschiede zwischen verschiedenen Züchtungen:

In einer Studie, die intrahippokampale Pilocarpin-Injektion bei Ratten vom Wistar-Stamm untersuchte, wurden Unterschiede in der Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Anfalls zwischen Ratten von verschiedenen Züchtungen festgestellt. Sogar Ratten, die zu verschiedenen Zeitpunkten von derselben Züchtung bezogen wurden, wiesen unterschiedliche Anfallsvorkommen auf, was anhand eines mittels Verhaltensbeobachtungen kalkulierten „total seizure severity scores“ beschrieben wurde (Portelli et al., 2009). Während der erforderlichen Narkosen wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass manche Ratten resistenter gegen Isofluran-Narkose sind als andere. Diese Beobachtung weist auf eine mögliche Variabilität der Ratten hin, die sich auch in der Vulnerabilität durch die PPS widerspiegeln könnte.

## 5.7. Übertragbarkeit

Neben fehlender Gyrierung im Rattenhirn ist ein wesentlicher Unterschied des Rattenhirns zu dem des Menschen, dass Ratten viel mehr Kommissuren besitzen (Paxinos, 2015). So tritt beim Menschen meist eine einseitige HS auf, da die Verbindung zur kontralateralen Gehirnhälfte weniger ausgeprägt ist. Trotzdem kann angenommen werden, dass Kommissuren an der pathologischen Entwicklung der mTLE beteiligt sind, wie in verschiedenen Studien gezeigt wurde (Unterberger et al., 2016; Wei et al., 2017). Daher kann eine Wirksamkeit der Stimulation von Kommissuren, wie der VHC, im Rattenmodell durchaus Schlüsse auf eine mögliche Wirksamkeit bei Patienten zulassen. Die VHC stellt eine kommissurale Verbindung der beiden Hippokampi im Rattenhirn dar (Swanson et al., 1978). Im menschlichen Gehirn ist diese Kommissur nicht vorhanden. Allerdings existiert die dorsale hippokampale Kommissur, die die beiden Hippokampi über die FF miteinander verbindet (Colnat-Coulbois et al., 2010; Gloor et al., 1993). Unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe von Durand zeigen laut Rashid et al. (2012) bereits die Wirksamkeit der LFS dieser Kommissur anhand reduzierter interiktaler und iktaler Aktivitäten im EEG beim Menschen. Die Funktion der dorsalen hippokampalen Kommissur ist bislang nicht ganz geklärt, allerdings wurde gezeigt, dass eine direkte Aktivierung der Hippokampi über diese Kommissur erzielt werden kann.

Im Vergleich von klinischen und präklinischen Studien zur Wirkung verschiedener Antikonvulsiva wurde festgestellt, dass die Wirksamkeit einiger Antikonvulsiva in verschiedenen Tierversuchen nicht nachgewiesen werden konnte. Allerdings kann dies unter anderem durch die starke Schädigung eines konvulsiven SE, der in den meisten Modellen als Auslöser der Epileptogenese verwendet wird, zurückgeführt werden (Löscher und Brandt, 2010). Das hier verwendete Modell beruht dagegen nicht auf dem Auslösen eines konvulsiven SE.

MiRNAs gelten als hoch konserviert (Lau et al., 2001). Durch Vergleich der Sequenzen der untersuchten miRNAs in Ratte und Mensch wurde außerdem sichergestellt, dass die näher untersuchten miRNAs über die Spezies konserviert sind. Weiterhin wurde bei der MIT-Analyse ein Grenzwert anhand des hsa\_ und rno\_Pscores festgelegt, um nicht ausschließlich Interaktionen in Ratten darzustellen. Daher ist eine Interaktion, die im Rattenmodell identifiziert wurde, auch beim Menschen zu erwarten. Eine Studie zur miRNA-Regulation bei menschlicher mTLE hat allerdings einige miRNAs identifiziert, die in Tiermodellen bislang nicht als relevant eingestuft wurden und hat außerdem für einige aus Tiermodellen bekannte miRNAs keine Regulation festgestellt (Bencurova et al., 2017). In menschlichem Hirngewebe von mTLE-Patienten wurde außerdem ein hoher Anteil der gemessenen miRNAs herunterreguliert (51 %) und nur etwa 5 % der gemessenen miRNAs waren signifikant hochreguliert (McKiernan et al., 2012), was gegensätzlich zu unseren und den Daten anderer veröffentlichter Tierstudien zur Epilepsie ist (Alsharafi et al. 2015; Gorter et al. 2014). In unseren Daten waren 2/3 der miRNAs, die in der Kontrollgruppe nach 97 Tagen signifikant reguliert waren, höher exprimiert als nach 14 Tagen. Diese Unterschiede können auf eine suboptimale Übertragbarkeit von miRNA-Daten aus Tiermodellen hinweisen. Allerdings können sie auch aufgrund von unzureichendem Kontrollgewebe bei Studien mit menschlichem Gewebe zustande kommen, da meist Kontrollgewebe von Autopsien genutzt wird, welches also nach dem Tod entnommen wird und so gegebenenfalls die miRNA-Expression im Kontrollgewebe durch andere Faktoren beeinflusst wird. Außerdem stammt das untersuchte Gewebe meist von Patienten, die eine weit vorangeschrittene Epilepsie aufweisen, wohingegen hier die miRNA-Expression während der Epileptogenese und in einer vergleichsweise frühen chronischen Phase der Epilepsie beschrieben ist.

## 5.8. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst im Tiermodell der mTLE-HS untersucht, ob die elektrische hoch- oder niedrigfrequente Stimulation jeweils einer von vier verschiedenen Zielstrukturen (PP, DG, FF, VHC) über 1 bzw. 2 Wochen die Entstehung

einer mTLE-HS verzögern (antiepileptogener Effekt) oder die Anfallsfrequenz nach Manifestation der Epilepsie dauerhaft verringern kann (antiepileptischer Effekt). Die niedrigfrequente Stimulation der VHC wurde als antiepileptogen identifiziert. Darüber hinaus ist auch ein antiepileptischer Effekt der niedrigfrequenten VHC-DBS möglich, würde aber durch eine erhöhte Anfallsfrequenz durch Implantation der VHC-Elektroden zunichtegemacht.

In einem zweiten Schritt wurde die Assoziation der antiepileptogenen VHC-DBS mit Veränderungen der hippokampalen miRNA-Expression nachgewiesen. MiRNA-Gruppen mit gleichen Regulationsmustern wurden identifiziert. Insbesondere ist die VHC-DBS offenbar dazu geeignet, die Epileptogenese-assoziierte Regulation verschiedener miRNAs zu unterdrücken. Dazu gehörte unter anderem die miRNA-129-5p, welche bereits in zahlreichen Studien im Zusammenhang mit der Epileptogenese untersucht wurde. Diese miRNAs sind vermutlich unter anderem in den MAPK-Signalweg involviert. Eine weitere Gruppe von miRNAs war direkt nach der VHC-DBS signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe reguliert. Diese miRNAs könnten also den akuten Effekt der DBS vermitteln und sind vermutlich in den Fettsäureabbau-Signalweg involviert.

Die vorliegende explorative Arbeit wies Korrelationen nach, konnte aber aufgrund des Designs keine Kausalzusammenhänge nachweisen. Hierfür ist eine *in vivo* Manipulation mittels Antagonisierung oder Mimics bzw. viral delivery erforderlich. Solche Versuche befinden sich in Durchführung.

Die 5 miRNAs (miRNA-129-5p, miRNA-379-3p, miRNA-410-3p, miRNA-431, miRNA-433-3p), deren Epileptogenese-assoziierte Hochregulation durch die VHC-DBS unterdrückt wurde, bieten sich als Kandidaten für eine solche *in vivo* Manipulation an. Falls ein kausaler Zusammenhang zwischen der Hochregulation dieser miRNAs und der Epileptogenese besteht, sollte eine Antagonisierung analog zur VHC-DBS zu einer Verzögerung der Epileptogenese führen. Für die miRNA-129-5p wurde ein Effekt auf den Schweregrad von Anfällen nach einem SE bereits nachgewiesen (Rajman et al., 2017). MiRNA-431 und miRNA-379-3p werden aufgrund der insgesamt niedrigen Expression im Hippokampus nicht für eine *in vivo* Manipulation herangezogen. MiRNA-410-3p wurde nicht für die *in vivo* Manipulation ausgewählt, da sie kontroverse Ergebnisse in früher erhobenen Daten zur miRNA-Expression im gleichen Tiermodell zeigte. MiRNA-433-3p hingegen zeigte im gleichen Tiermodell eine pathologische Hochregulation während und nach der Epileptogenese und wird daher in einem Folgeprojekt mittels Antagonisierung durch intracerebroventrikuläre Injektion eines

Antagomirs näher untersucht. Der Nachweis einer Beteiligung von miRNAs am Prozess der Epileptogenese ist von hohem Interesse für eine kausale Epilepsietherapie.

## 5. Abkürzungsverzeichnis

Acadm	Acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain
Acsf6	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 6
Ago2	Agonaute2
ALG12	1,6-mannosyltransferase
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANT	Anteriorer Nukleus der Thalamus
AP	anterior-posterior
Atp1b3	ATPase plasma membrane Ca <sup>2+</sup> transporting 1
Atp2b1	ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting subunit beta
AZIN1	Antizyme inhibitor 1
CA	Cornu ammonis
Cacng2	Calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 2
Calm1	Calmodulin1
ccnd1	Cyclin D1
CFC	Cardiofaciocutaneous
Creb5	cAMP responsive element binding protein 5
CT	Computer-Tomographie
DBS	deep brain stimulation
Dcx	Doublecortin
DG	dentate gyrus; Gyrus dentatus
Dusp	Dual specificity phosphatase
DV	dorsal-ventral
EEG	Elektroencephalographie
Ehhadh	Enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase
Elk4	Elk4, ETS transcription factor
Ets1	ETS proto-oncogene 1, transcription factor
FF	Fimria-Fornix-Formation

Fgfr2	Fibroblast growth factor receptor
Fgf13	Fibroblast growth factor
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
Gng5	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-5
GRB2	growth factor receptor bound 2
Hdac1	Histone deacetylase 1
HFS	high frequency stimulation
HMPAP	c-99m- Hexamethylpropylenaminoxim
HS	Hippocampussklerose
icv	intracerebroventrikulär
Igf1	Internatinal League against Epilepsy
IL	Interleukin
ILAF	Insulin-like growth factor 1
IP	Immunfällung (immunoprecipitation)
Kitlg	Kit ligand
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Lamtor3	Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 3
LFS	low frequency stimulation
LTD	long-term depression
LNA	locked nucleic acid
Man1a1	Mannosidase, alpha, class 1A, member 1
Man1a2	Mannosidase, alpha, class 1A, member 2
Man1c1	Mannosidase, alpha, class 1C, member 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Map4k4	Mitogen-activated protein kinase 4
MEG	Magnetencephalographie
miRNA	mikroRNA
mRNA	messenger ribonucleic acid
ML	medial-lateral
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie

mTLE	mesiale Temporallappenepilepsie
MTI	miRNA-target-interaction
mTor	mechanistic Target of Rapamycin
Nlk	Nemo like kinase
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Nras	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
Nr4a1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
Ntf3	Neurotrophin 3
Ntrk2	Neurotrophic receptor tyrosine kinase 2
Pak	P21 (RAC1) activated kinase
PCR	Polymerase chain reaction
Pdgfra	Platelet derived growth factor receptor alpha
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Plce1	Phospholipase C, epsilon 1
PP	Performant pathway, Tractus performant
PPS	Perforant pathway stimulation
Prkca	Protein kinase C, alpha
PTZ	Pentylentetrazol
Rab5b	RAB5B, member RAS oncogene family
Ralbp1	RalA binding protein 1
Rapgef2	Rap guanine nucleotide exchange factor 2
Pap1a	member of RAS oncogene family Colony stimulating factor 1
RISC	RNA-induced-silencing-complex
rno	Rattus norwegicus
rpm	reads per million
Rps6ka5	Ribosomal protein S6 kinase A5
RT-PCR	reverse transcription- polymerase chain reaction
SE	Status epilepticus
Slc18a2	solute carrier family 18 member A2
sos1	



SPECT	SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1
SUDEP	Single-Photon-Emissions-Computertomographie
Tab1	Sudden unexpected death in Epilepsie
TCF	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein
Tcf7l2	Transcription factor 7
TE	Transcription factor 7 like 2
TPM1	Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid
Trpv5	Tropomyosin 1, alpha
Tulp1	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 5
Vegfa	Tubby-like protein 1
VHC	Vascular endothelial growth factor A
ZNS	Ventral hippocampal commissure
	Zentrales Nervensystem

## 6. Abbilungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1 Ratte während der Elektrodenimplantation.....	32
Abbildung 2 Beispiel für ein evoziertes Potential abgeleitet aus der Körnerschicht des DG während Stimulation des PP mit 20 V (Doppelpulse mit 40 ms Pulsabstand und Pulsdauer von 0,1 ms). Das Signal wurde für die Darstellung 10fach verstärkt.....	35
Abbildung 3 Stimulationsparadigma der PPS mit kontinuierlichen 2 Hz Doppelpulsen von 20 V und zusätzlichen 10-sekündigen 20 Hz Einzelpuls-Trains (grafische Darstellung nicht maßstabsgerecht).....	36
Abbildung 4 Ratte während der DBS über ein bissfestes Kabel, welches über einen drehbaren Kommutator im Käfigdeckel mit dem Stimulator verbunden ist. Die Ratte kann sich während der Langezeitstimulation frei in ihrem Käfig bewegen. ....	38
Abbildung 5 Zeitverlauf des ersten Versuchsteils zur Evaluierung der antiepileptogenen Wirkung der DBS einen Tag nach 8 stündiger PPS. PP: Tractus Perforans, DG: Gyrus Dentatus, FF: Fimbria-Fornix-Formation, VHC: ventrale hippocampale Kommissur....	43
Abbildung 6 Zeitverlauf des zweiten Versuchsteils zur Evaluierung der krankheitsmodifizierenden Wirkung der DBS einen bis drei Tage nach dem ersten spontanen Anfall. PP: Tractus Perforans, DG: Gyrus Dentatus, FF: Fimbria-Fornix-Formation, VHC: ventrale hippocampale Kommissur .....	44
Abbildung 7 Zeitverlauf des Versuchs zur Generierung der Hippokampi für die Evaluierung des direkten Effekts der VHC-DBS mit 1 Hz und 1 V auf die miRNA-Expression mittels miRNA-Sequenzierung.....	45
Abbildung 8 Anzahl der verwendeten Tiere für die Versuchsgruppen. ....	51
Abbildung 9 Evozierte Potentiale bei FF-Stimulation.....	52
Abbildung 10 Evozierte Potentiale während VHC-DBS .....	52
Abbildung 11 Beispiel für physiologische Theta-Aktivität dargestellt mittels EDF-Browser. ....	53
Abbildung 12 Beispiel für einen Anfall dargestellt mittels EDF-Browser .....	53
Abbildung 13 Beispiel für Polyspikes dargestellt mittels EDF-Browser.....	54
Abbildung 14 Beispiel für „Sharp Waves“ dargestellt mittels EDF-Browser. ....	54
Abbildung 15 Beispiel für Putzartefakte dargestellt mittels EDF-Browser.....	55
Abbildung 16 Latenzperioden nach Applikation verschiedener DBS-Paradigmen. * p=0,004. ....	56
Abbildung 17 Kumulative Anfallsfrequenz während der Ableitperiode.....	57
Abbildung 18 Anfallsfrequenz nach DBS während manifester Epilepsie. ....	58
Abbildung 19 Anfallsfrequenz während der DBS.....	59
Abbildung 20 Heatmap-Analyse der 100 miRNAs, die in den sequenzierten Hippokampi am stärksten exprimiert waren. ....	61
Abbildung 21 Hauptkomponentenanalyse der miRNA-Expression der sequenzierten Hippokampi.....	62
Abbildung 22 Übersicht der Verfahren zur Einteilung der gemessenen miRNAs in Gruppen möglicher relevanter Expressionsmuster.....	64
Abbildung 23 Clusteranalyse der signifikant regulierten miRNAs. ....	65
Abbildung 24 Expressionsmuster der signifikant regulierten miRNAs. ....	67
Abbildung 25 Expression der miRNA-129-5p.....	68
Abbildung 26 Expression der miRNA-397-3p.....	69
Abbildung 27 Expression der miRNA-433-3p.....	70
Abbildung 28 Expression der miRNA-431.....	70

Abbildung 29 Expression der miRNA-410-3p.....	71
Abbildung 30 Expression der miRNA-129-2-3p.....	73
Abbildung 31 Expression der miRNA-24-3p.....	74
Abbildung 32 Expression der miRNA-let-7d-5p.....	74
Abbildung 33 Expression der miRNA-181a-1-3p.....	75
Abbildung 34 Expression der let-7d-3p.....	76
Abbildung 35 Expression der let-7e-5p.....	77
Abbildung 36 Expression der let-7d-5p.....	78
Abbildung 37 Expression der let-7a-1-3p.....	78
Abbildung 38 MTI mit einem hsa_Pscore und rno_Pscore von >0,55 für die Interaktion mit mindestens einer der 5 miRNAs, die als relevant für den Effekt der VHC-DBS auf die Epileptogenese befunden wurden. Die Farbe der Verbindungslinien gibt an in welcher Spezies die Vorhersage gegeben ist. Die Farbe der Kreise gibt an ob es sich um einen Transkriptionsfaktor handelt (rot) oder nicht (schwarz). ....	80
Abbildung 39 MTI mit einem hsa_Pscore und rno_Pscore von >0,45 für die Interaktion mit mindestens einer der 3 miRNAs, die direkt nach der VHC-DBS signifikant herunterreguliert waren.....	81
Abbildung 40 MTI mit einem hsa_Pscore und rno_Pscore von >0,5 für die Interaktion mit mindestens einer der 5 miRNAs, die direkt nach der VHC-DBS signifikant hochreguliert waren. ....	82
Abbildung 41 qPCR-Analyse von 4 potentiellen mRNA-Targets der miRNA-433-3p im Hippokampus von 3 VHC-stimulierten Ratten verglichen mit 3 nicht-Langzeit-stimulierten Ratten 97 Tage nach PPS. Gezeigt sind Expressionsveränderungen analysiert nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode. Die gemessenen Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant (T-Test). ....	84
Tabelle 1: Mögliche Wirkmechanismen der DBS .....	12
Tabelle 2: Vergleich der humanen mTLE-HS und des 30-30-8-PPS Modells bei Ratten bezüglich typischer Charakteristika der Krankheit.....	21
Tabelle 3: Koordinaten der Elektrodenpositionen für die PPS, Ableitung aus dem DG und DBS der Stimulationsziele.....	32
Tabelle 4: Übersicht der Versuchsgruppen und der jeweiligen Behandlungen .....	46
Tabelle 5: MiRNAs, die in den sequenzierten Hippokampi mit >100 RPM detektiert wurden.....	59
Tabelle 6: Verschiedene Expressionsmuster der signifikant regulierten miRNAs und relatives Ausmaß der Regulation. ....	72
Tabelle 7: MIT-Analyse der Interaktionen von miRNA-433-3p und den 4 untersuchten mRNAs (AZIN1, GRB2, KRAS, MAPK8).....	83
Tabelle 8: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)-Signalwege, die mit einem p-Wert von <0,1 als reguliert von den 8 beschriebenen miRNAs (miRNA-129-2-3p, miRNA-24-3p, let-7b-5p, miRNA-181a-1-3p, let-7d-3p, let-7e-5p, let-7d-5p, let-7a-1-3p) identifiziert wurden. Die Signalweg-Analyse wurde mit der DIANA Tool Software unter Verwendung der microT-CDS mit einem Schwellenwert von 0,8 erstellt. Aufgelistet sind hier ausschließlich Signalwege, Krankheiten die bei der Analyse aufgelistet wurden, sind hier nicht angezeigt.....	85

Tabelle 9: KEGG-Signalwege, die mit einem p-Wert von $<0,1$ als reguliert von den 5 beschriebenen miRNAs (miRNA-129, miRNA-379-3p, miRNA-410-3p, miRNA-433-3p und miRNA-431) identifiziert wurden. Die Signalweg-Analyse wurde mit der DIANA Tool Software unter Verwendung der microT-CDS mit einem Schwellenwert von 0,8 erstellt. ....	86
Tabelle 10: Übersicht einiger wirksamer DBS-Paradigmen in Tiermodellen .....	89

## 8. Literaturverzeichnis

- Albensi, B.C., Ata, G., Schmidt, E., Waterman, J.D., and Janigro, D. (2004). Activation of long-term synaptic plasticity causes suppression of epileptiform activity in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 998, 56–64.
- Alsharafi, W.A., Xiao, B., Abuhamed, M.M., and Luo, Z. (2015). miRNAs: biological and clinical determinants in epilepsy. *Front. Mol. Neurosci.* 8.
- Amaral, D.G., and Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571–591.
- Amato, F., Seia, M., Giordano, S., Elce, A., Zarrilli, F., Castaldo, G., and Tomaiuolo, R. (2013). Gene mutation in microRNA target sites of CFTR gene: a novel pathogenetic mechanism in cystic fibrosis? *PloS One* 8, e60448.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., et al. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9, 277–279.
- Amorim, B.O., Covan, L., Ferreira, E., Brito, J.G., Nunes, D.P., de Moraes, D.G., Nobrega, J.N., Rodrigues, A.M., deAlmeida, A.C.G., and Hamani, C. (2015). Deep brain stimulation induces antiapoptotic and anti-inflammatory effects in epileptic rats. *J. Neuroinflammation* 12, 162.
- Androulidaki, A., Iliopoulos, D., Arranz, A., Doxaki, C., Schworer, S., Zacharioudaki, V., Margioris, A.N., Tschlis, P.N., and Tsatsanis, C. (2009). Akt1 controls macrophage response to LPS by regulating microRNAs. *Immunity* 31, 220–231.
- Andy, O.J., Jurko, M.F., and Sias, F.R. (1963). SUBTHALAMOTOMY IN TREATMENT OF PARKINSONIAN TREMOR. *J. Neurosurg.* 20, 860–870.
- Argaw, A.T., Asp, L., Zhang, J., Navrazhina, K., Pham, T., Mariani, J.N., Mahase, S., Dutta, D.J., Seto, J., Kramer, E.G., et al. (2012). Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J. Clin. Invest.* 122, 2454–2468.
- Aronica, E., Fluiter, K., Iyer, A., Zurolo, E., Vreijling, J., van Vliet, E.A., Baayen, J.C., and Gorter, J.A. (2010). Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* 31, 1100–1107.
- Aronica, E., Bauer, S., Bozzi, Y., Caleo, M., Dingledine, R., Gorter, J.A., Henshall, D.C., Kaufer, D., Koh, S., Löscher, W., et al. (2017). Neuroinflammatory targets and treatments for epilepsy validated in experimental models. *Epilepsia* 58 Suppl 3, 27–38.
- Balosso, S., Ravizza, T., Perego, C., Peschon, J., Campbell, I.L., De Simoni, M.G., and Vezzani, A. (2005). Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits seizures in mice via p75 receptors. *Ann. Neurol.* 57, 804–812.
- Bar-Klein, G., Klee, R., Brandt, C., Bankstahl, M., Bascuñana, P., Töllner, K., Dalipaj, H., Bankstahl, J.P., Friedman, A., and Löscher, W. (2016). Isoflurane prevents acquired epilepsy in rat models of temporal lobe epilepsy. *Ann. Neurol.* 80, 896–908.
- Bartholow R. (1874). Experimental investigations into the functions of the human brain. *Am. J. Med. Sci.* 134.

- Ben-Ari, Y., and Represa, A. (1990). Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fibre sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci.* **13**, 312–318.
- Bencurova, P., Baloun, J., Musilova, K., Radova, L., Tichy, B., Pail, M., Zeman, M., Brichtova, E., Hermanova, M., Pospisilova, S., et al. (2017). MicroRNA and mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: Whole miRNome profiling of human hippocampus. *Epilepsia*.
- Bethmann, K., Brandt, C., and Löscher, W. (2007). Resistance to phenobarbital extends to phenytoin in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **48**, 816–826.
- Béthune, J., Artus-Revel, C.G., and Filipowicz, W. (2012). Kinetic analysis reveals successive steps leading to miRNA-mediated silencing in mammalian cells. *EMBO Rep.* **13**, 716–723.
- Blasiak, T., Czubak, W., Ignaciak, A., and Lewandowski, M.H. (2010). A new approach to detection of the bregma point on the rat skull. *J. Neurosci. Methods* **185**, 199–203.
- Blümcke, I., Thom, M., and Wiestler, O.D. (2002). Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **12**, 199–211.
- Blümcke, I., Thom, M., Aronica, E., Armstrong, D.D., Bartolomei, F., Bernasconi, A., Bernasconi, N., Bien, C.G., Cendes, F., Coras, R., et al. (2013). International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia* **54**, 1315–1329.
- Blumcke, I., Spreafico, R., Haaker, G., Coras, R., Kobow, K., Bien, C.G., Pfäfflin, M., Elger, C., Widman, G., Schramm, J., et al. (2017). Histopathological Findings in Brain Tissue Obtained during Epilepsy Surgery. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1648–1656.
- Boëx, C., Seeck, M., Vulliémoz, S., Rossetti, A.O., Staedler, C., Spinelli, L., Pegna, A.J., Pralong, E., Villemure, J.-G., Foletti, G., et al. (2011). Chronic deep brain stimulation in mesial temporal lobe epilepsy. *Seizure* **20**, 485–490.
- Boison, D. (2005). Adenosine and epilepsy: from therapeutic rationale to new therapeutic strategies. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* **11**, 25–36.
- Boison, D. (2008). The adenosine kinase hypothesis of epileptogenesis. *Prog. Neurobiol.* **84**, 249–262.
- Bot, A.M., Dębski, K.J., and Lukasiuk, K. (2013). Alterations in miRNA levels in the dentate gyrus in epileptic rats. *PloS One* **8**, e76051.
- Bragin, A., Wilson, C.L., and Engel, J. (2002a). Increased afterdischarge threshold during kindling in epileptic rats. *Exp. Brain Res.* **144**, 30–37.
- Bragin, A., Wilson, C.L., and Engel, J. (2002b). Rate of interictal events and spontaneous seizures in epileptic rats after electrical stimulation of hippocampus and its afferents. *Epilepsia* **43 Suppl 5**, 81–85.
- Brandt, C., Ebert, U., and Löscher, W. (2004). Epilepsy induced by extended amygdala-kindling in rats: lack of clear association between development of spontaneous seizures and neuronal damage. *Epilepsy Res.* **62**, 135–156.
- Brennan, G.P., and Henshall, D.C. (2016). microRNAs in the pathophysiology of epilepsy. *Neurosci. Lett.*

Brennan, G.P., Dey, D., Chen, Y., Patterson, K.P., Magnetta, E.J., Hall, A.M., Dube, C.M., Mei, Y.-T., and Baram, T.Z. (2016). Dual and opposing roles of microRNA-124 in epilepsy are mediated through inflammatory and NRSF-dependent gene networks. *Cell Rep.* **14**, 2402–2412.

Bumanglag, A.V., and Sloviter, R.S. (2008). Minimal latency to hippocampal epileptogenesis and clinical epilepsy after perforant pathway stimulation-induced status epilepticus in awake rats. *J. Comp. Neurol.* **510**, 561–580.

Busceti, C.L., Biagioni, F., Aronica, E., Riozzi, B., Storto, M., Battaglia, G., Giorgi, F.S., Gradini, R., Fornai, F., Caricasole, A., et al. (2007). Induction of the Wnt inhibitor, Dickkopf-1, is associated with neurodegeneration related to temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **48**, 694–705.

Busquets, O., Ettcheto, M., Verdaguer, E., Castro-Torres, R.D., Auladell, C., Beas-Zarate, C., Folch, J., and Camins, A. (2018). JNK1 inhibition by Licochalcone A leads to neuronal protection against excitotoxic insults derived of kainic acid. *Neuropharmacology* **131**, 440–452.

Cao, H., Alrejaye, N., Klein, O.D., Goodwin, A.F., and Oberoi, S. (2017). A review of craniofacial and dental findings of the RASopathies. *Orthod. Craniofac. Res.* **20**, 32–38.

Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **75**, 50–83.

Carlson, C., and Devinsky, O. (2009). The excitable cerebral cortex Fritsch G, Hitzig E. Über die elektrische Erregbarkeit des Grosshirns. *Arch Anat Physiol Wissen* 1870;37:300-32. *Epilepsy Behav.* **EB 15**, 131–132.

Cekanaviciute, E., Fathali, N., Doyle, K.P., Williams, A.M., Han, J., and Buckwalter, M.S. (2014). Astrocytic transforming growth factor-beta signaling reduces subacute neuroinflammation after stroke in mice. *Glia* **62**, 1227–1240.

Chen, N., Gao, Y., Yan, N., Liu, C., Zhang, J.-G., Xing, W.-M., Kong, D.-M., and Meng, F.-G. (2014). High-frequency stimulation of the hippocampus protects against seizure activity and hippocampal neuronal apoptosis induced by kainic acid administration in macaques. *Neuroscience* **256**, 370–378.

Chen, Y.-C., Zhu, G.-Y., Wang, X., Shi, L., Jiang, Y., Zhang, X., and Zhang, J.-G. (2017). Deep brain stimulation of the anterior nucleus of the thalamus reverses the gene expression of cytokines and their receptors as well as neuronal degeneration in epileptic rats. *Brain Res.* **1657**, 304–311.

Cheng, F., and Nussinov, R. (2018). KRAS Activating Signaling Triggers Arteriovenous Malformations. *Trends Biochem. Sci.*

Chkhenkeli, S.A., Sramka, M., Lortkipanidze, G.S., Rakviashvili, T.N., Bregvadze, E.S., Magalashvili, G.E., Gagoshidze, T.S., and Chkhenkeli, I.S. (2004). Electrophysiological effects and clinical results of direct brain stimulation for intractable epilepsy. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **106**, 318–329.

Christensen, M., Larsen, L.A., Kauppinen, S., and Schratt, G. (2010). Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated microRNA Delivery into the Postnatal Mouse Brain Reveals a Role for miR-134 in Dendritogenesis in Vivo. *Front. Neural Circuits* **3**.

- Colnat-Coulbois, S., Mok, K., Klein, D., Pénicaud, S., Tanriverdi, T., and Olivier, A. (2010). Tractography of the amygdala and hippocampus: anatomical study and application to selective amygdalohippocampectomy. *J. Neurosurg.* 113, 1135–1143.
- Cooper, I.S., Amin, I., and Gilman, S. (1973). The effect of chronic cerebellar stimulation upon epilepsy in man. *Trans. Am. Neurol. Assoc.* 98, 192–196.
- Cooper, I.S., Amin, I., Riklan, M., Waltz, J.M., and Poon, T.P. (1976). Chronic cerebellar stimulation in epilepsy. Clinical and anatomical studies. *Arch. Neurol.* 33, 559–570.
- Cornford, null, and Hyman, null (1999). Blood-brain barrier permeability to small and large molecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36, 145–163.
- Cuéllar-Herrera, M., Velasco, M., Velasco, F., Velasco, A.L., Jiménez, F., Orozco, S., Briones, M., and Rocha, L. (2004). Evaluation of GABA System and Cell Damage in Parahippocampus of Patients with Temporal Lobe Epilepsy Showing Antiepileptic Effects after Subacute Electrical Stimulation. *Epilepsia* 45, 459–466.
- Cuellar-Herrera, M., Neri-Bazan, L., and Rocha, L.L. (2006). Behavioral effects of high frequency electrical stimulation of the hippocampus on electrical kindling in rats. *Epilepsy Res.* 72, 10–17.
- Cui, L., Ding, Y., Feng, Y., Chen, S., Xu, Y., Li, M., Hu, M., Qiu, Z., and Ding, M. (2017). MiRNAs are involved in chronic electroacupuncture tolerance in the rat hypothalamus. *Mol. Neurobiol.* 54, 1429–1439.
- Cukiert, A., Cukiert, C.M., Burattini, J.A., and Lima, A.M. (2014). Seizure outcome after hippocampal deep brain stimulation in a prospective cohort of patients with refractory temporal lobe epilepsy. *Seizure* 23, 6–9.
- Cymerblit-Sabba, A., Schiller, M., and Schiller, Y. (2013). Termination of Chemoconvulsant-Induced Seizures by Synchronous and Asynchronous Electrical Stimulation of the Hippocampus In-Vivo. *Brain Stimulat.* 6, 727–736.
- Davis, S., Propp, S., Freier, S.M., Jones, L.E., Serra, M.J., Kinberger, G., Bhat, B., Swayze, E.E., Bennett, C.F., and Esau, C. (2009). Potent inhibition of microRNA in vivo without degradation. *Nucleic Acids Res.* 37, 70–77.
- Deller, T., Adelmann, G., Nitsch, R., and Frotscher, M. (1996). The alvear pathway of the rat hippocampus. *Cell Tissue Res.* 286, 293–303.
- Dingledine, R., Coulter, D.A., Fritsch, B., Gorter, J.A., Lelutiu, N., McNamara, J., Nadler, J.V., Pitkänen, A., Rogawski, M.A., Skene, P., et al. (2017). Transcriptional profile of hippocampal dentate granule cells in four rat epilepsy models. *Sci. Data* 4.
- Duncan, J.S., and Sagar, H.J. (1987). Seizure characteristics, pathology, and outcome after temporal lobectomy. *Neurology* 37, 405–409.
- Ebert, M.S., and Sharp, P.A. (2012). Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell* 149, 515–524.
- Ekmekçi, H., and Kaptan, H. (2017). Vagus Nerve Stimulation. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* 5, 391–394.



- Engel, J. (1996). Clinical evidence for the progressive nature of epilepsy. *Epilepsy Res. Suppl.* 12, 9–20.
- Engel JR, and Schwarzkron, P.A. (2006). CHAPTER 1 - What Should Be Modeled? In *Models of Seizures and Epilepsy*, (Burlington: Academic Press), pp. 1–14.
- Englot, D.J., and Chang, E.F. (2014). Rates and predictors of seizure freedom in resective epilepsy surgery: an update. *Neurosurg. Rev.* 37, 389–404; discussion 404–405.
- Englot, D.J., Chang, E.F., and Auguste, K.I. (2011). Vagus nerve stimulation for epilepsy: a meta-analysis of efficacy and predictors of response. *J. Neurosurg.* 115, 1248–1255.
- Englot, D.J., Birk, H., and Chang, E.F. (2016). Seizure outcomes in nonresective epilepsy surgery: an update. *Neurosurg. Rev.* 1–14.
- Eyo, U.B., Murugan, M., and Wu, L.-J. (2017). Microglia-Neuron Communication in Epilepsy. *Glia* 65, 5–18.
- Fayyad-Kazan, H., Hamade, E., Rouas, R., Najar, M., Fayyad-Kazan, M., El Zein, N., ElDirani, R., Hussein, N., Fakhry, M., Al-Akoun, C., et al. (2014). Downregulation of microRNA-24 and -181 parallels the upregulation of IFN- $\gamma$  secreted by activated human CD4 lymphocytes. *Hum. Immunol.* 75, 677–685.
- Feng, L.-B., Pang, X.-M., Zhang, L., Li, J.-P., Huang, L.-G., Su, S.-Y., Zhou, X., Li, S.-H., Xiang, H.-Y., Chen, C.-Y., et al. (2015). MicroRNA involvement in mechanism of endogenous protection induced by fastigial nucleus stimulation based on deep sequencing and bioinformatics. *BMC Med. Genomics* 8.
- Fernandes, J.R.D., Jain, S., and Banerjee, A. (2017). Expression of ODC1, SPD, SPM and AZIN1 in the hypothalamus, ovary and uterus during rat estrous cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 246, 9–22.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102–114.
- Fiore, R., Khudayberdiev, S., Christensen, M., Siegel, G., Flavell, S.W., Kim, T.-K., Greenberg, M.E., and Schratt, G. (2009). Mef2-mediated transcription of the miR379–410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. *EMBO J.* 28, 697–710.
- Fisher, R., Salanova, V., Witt, T., Worth, R., Henry, T., Gross, R., Oommen, K., Osorio, I., Nazzaro, J., Labar, D., et al. (2010). Electrical stimulation of the anterior nucleus of thalamus for treatment of refractory epilepsy. *Epilepsia* 51, 899–908.
- Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., and Engel, J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46, 470–472.
- Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel, J., Forsgren, L., French, J.A., Glynn, M., et al. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55, 475–482.

French, J.A., Williamson, P.D., Thadani, V.M., Darcey, T.M., Mattson, R.H., Spencer, S.S., and Spencer, D.D. (1993). Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann. Neurol.* 34, 774–780.

Frigerio, F., Frasca, A., Weissberg, I., Parrella, S., Friedman, A., Vezzani, A., and Noé, F.M. (2012). Long-lasting pro-ictogenic effects induced in vivo by rat brain exposure to serum albumin in the absence of concomitant pathology. *Epilepsia* 53, 1887–1897.

Frotscher, M., Haas, C.A., and Förster, E. (2003). Reelin controls granule cell migration in the dentate gyrus by acting on the radial glial scaffold. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 13, 634–640.

Gao, J., Wang, W.-Y., Mao, Y.-W., Graff, J., Guan, J.-S., Pan, L., Mak, G., Kim, D., Su, S.C., and Tsai, L.-H. (2010). A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* 466, 1105–1109.

Giordano, F., Zicca, A., Barba, C., Guerrini, R., and Genitori, L. (2017). Vagus nerve stimulation: Surgical technique of implantation and revision and related morbidity. *Epilepsia* 58 Suppl 1, 85–90.

Gloor, P., Salanova, V., Olivier, A., and Quesney, L.F. (1993). The human dorsal hippocampal commissure. An anatomically identifiable and functional pathway. *Brain J. Neurol.* 116 ( Pt 5), 1249–1273.

Golyala, A., and Kwan, P. (2017). Drug development for refractory epilepsy: The past 25 years and beyond. *Seizure* 44, 147–156.

Gondard, E., Chau, H.N., Mann, A., Tierney, T.S., Hamani, C., Kalia, S.K., and Lozano, A.M. (2015). Rapid Modulation of Protein Expression in the Rat Hippocampus Following Deep Brain Stimulation of the Fornix. *Brain Stimulat.* 8, 1058–1064.

Goodman, J.H., Berger, R.E., and Tcheng, T.K. (2005). Preemptive low-frequency stimulation decreases the incidence of amygdala-kindled seizures. *Epilepsia* 46, 1–7.

Gorter, J.A., Iyer, A., White, I., Colzi, A., van Vliet, E.A., Sisodiya, S., and Aronica, E. (2014a). Hippocampal subregion-specific microRNA expression during epileptogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 62, 508–520.

Gorter, J.A., Iyer, A., White, I., Colzi, A., van Vliet, E.A., Sisodiya, S., and Aronica, E. (2014b). Hippocampal subregion-specific microRNA expression during epileptogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 62, 508–520.

Gotanda, K., Hirota, T., Matsumoto, N., and Ieiri, I. (2013). MicroRNA-433 negatively regulates the expression of thymidylate synthase (TYMS) responsible for 5-fluorouracil sensitivity in HeLa cells. *BMC Cancer* 13, 369.

Gottlieb, D.I., and Cowan, W.M. (1973). Autoradiographic studies of the commissural and ipsilateral association connection of the hippocampus and dentate gyrus of the rat. I. The commissural connections. *J. Comp. Neurol.* 149, 393–422.

Gregory, R.I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235–240.

- Guo, L.-H., Li, H., Wang, F., Yu, J., and He, J.-S. (2013). The Tumor Suppressor Roles of miR-433 and miR-127 in Gastric Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 14171–14184.
- Guo, Z.-W., Xie, C., Yang, J.-R., Li, J.-H., Yang, J.-H., and Zheng, L. (2015). MtiBase: a database for decoding microRNA target sites located within CDS and 5'UTR regions from CLIP-Seq and expression profile datasets. *Database J. Biol. Databases Curation* *2015*.
- Hamani, C., Ewerton, F.I.S., Bonilha, S.M., Ballester, G., Mello, L.E.A.M., and Lozano, A.M. (2004). Bilateral anterior thalamic nucleus lesions and high-frequency stimulation are protective against pilocarpine-induced seizures and status epilepticus. *Neurosurgery* *54*, 191–195; discussion 195–197.
- Hansen, T.B., Jensen, T.I., Clausen, B.H., Bramsen, J.B., Finsen, B., Damgaard, C.K., and Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* *495*, 384–388.
- Hata, T., Mokutani, Y., Takahashi, H., Inoue, A., Munakata, K., Nagata, K., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Matsuda, C., et al. (2017). Identification of microRNA-487b as a negative regulator of liver metastasis by regulation of KRAS in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* *50*, 487–496.
- Hébert, S.S., and De Strooper, B. (2009). Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends Neurosci.* *32*, 199–206.
- Heck, C.N., King-Stephens, D., Massey, A.D., Nair, D.R., Jobst, B.C., Barkley, G.L., Salanova, V., Cole, A.J., Smith, M.C., Gwinn, R.P., et al. (2014). Two-year seizure reduction in adults with medically intractable partial onset epilepsy treated with responsive neurostimulation: final results of the RNS System Pivotal trial. *Epilepsia* *55*, 432–441.
- Heinz, R., Ferris, N., Lee, E.K., Radtke, R., Crain, B., Hoffman, J.M., Hanson, M., Paine, S., and Friedman, A. (1994). MR and positron emission tomography in the diagnosis of surgically correctable temporal lobe epilepsy. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* *15*, 1341–1348.
- Henshall, D.C., Hamer, H.M., Pasterkamp, R.J., Goldstein, D.B., Kjems, J., Prehn, J.H.M., Schorge, S., Lamottke, K., and Rosenow, F. (2016). MicroRNAs in epilepsy: pathophysiology and clinical utility. *Lancet Neurol.* *15*, 1368–1376.
- Herman, S.T. (2002). Epilepsy after brain insult Targeting epileptogenesis. *Neurology* *59*, S21–S26.
- Herrada, A.A., Contreras, F.J., Marini, N.P., Amador, C.A., González, P.A., Cortés, C.M., Riedel, C.A., Carvajal, C.A., Figueroa, F., Michea, L.F., et al. (2010). Aldosterone promotes autoimmune damage by enhancing Th17-mediated immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 191–202.
- Houser, C.R. (1990). Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* *535*, 195–204.
- Hu, H., Bandell, M., Grandl, J., and Petrus, M. (2011a). High-Throughput Approaches to Studying Mechanisms of TRP Channel Activation. In *TRP Channels*, M.X. Zhu, ed. (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis), p.
- Hu, K., Zhang, C., Long, L., Long, X., Feng, L., Li, Y., and Xiao, B. (2011b). Expression profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium–pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurosci. Lett.* *488*, 252–257.

- Huang, L.-G., Li, J.-P., Pang, X.-M., Chen, C.-Y., Xiang, H.-Y., Feng, L.-B., Su, S.-Y., Li, S.-H., Zhang, L., and Liu, J.-L. (2015). MicroRNA-29c Correlates with Neuroprotection Induced by FNS by Targeting Both Birc2 and Bak1 in Rat Brain after Stroke. *CNS Neurosci. Ther.* *21*, 496–503.
- Huang, S., Lv, Z., Guo, Y., Li, L., Zhang, Y., Zhou, L., Yang, B., Wu, S., Zhang, Y., Xie, C., et al. (2016). Identification of Blood Let-7e-5p as a Biomarker for Ischemic Stroke. *PLoS One* *11*, e0163951.
- Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 99–110.
- Iori, V., Maroso, M., Rizzi, M., Iyer, A.M., Vertemara, R., Carli, M., Agresti, A., Antonelli, A., Bianchi, M.E., Aronica, E., et al. (2013). Receptor for Advanced Glycation Endproducts is upregulated in temporal lobe epilepsy and contributes to experimental seizures. *Neurobiol. Dis.* *58*, 102–114.
- Iori, V., Iyer, A.M., Ravizza, T., Beltrame, L., Paracchini, L., Marchini, S., Cerovic, M., Hill, C., Ferrari, M., Zucchetti, M., et al. (2017). Blockade of the IL-1R1/TLR4 pathway mediates disease-modification therapeutic effects in a model of acquired epilepsy. *Neurobiol. Dis.* *99*, 12–23.
- Iyer, A., Zurolo, E., Prabowo, A., Fluiter, K., Spliet, W.G.M., van Rijen, P.C., Gorter, J.A., and Aronica, E. (2012). MicroRNA-146a: A Key Regulator of Astrocyte-Mediated Inflammatory Response. *PLoS ONE* *7*, e44789.
- Jeha, L.E., Najm, I.M., Bingaman, W.E., Khandwala, F., Widdess-Walsh, P., Morris, H.H., Dinner, D.S., Nair, D., Foldvary-Schaeffer, N., Prayson, R.A., et al. (2006). Predictors of outcome after temporal lobectomy for the treatment of intractable epilepsy. *Neurology* *66*, 1938–1940.
- Jensen, A.L., and Durand, D.M. (2009). High frequency stimulation can block axonal conduction. *Exp. Neurol.* *220*, 57–70.
- Jimenez-Mateos, E.M., and Henshall, D.C. (2013). Epilepsy and microRNA. *Neuroscience* *238*, 218–229.
- Jimenez-Mateos, E.M., Bray, I., Sanz-Rodriguez, A., Engel, T., McKiernan, R.C., Mouri, G., Tanaka, K., Sano, T., Saugstad, J.A., Simon, R.P., et al. (2011). miRNA Expression Profile after Status Epilepticus and Hippocampal Neuroprotection by Targeting miR-132. *Am. J. Pathol.* *179*, 2519–2532.
- Jimenez-Mateos, E.M., Engel, T., Merino-Serrais, P., McKiernan, R.C., Tanaka, K., Mouri, G., Sano, T., O'Tuathaigh, C., Waddington, J.L., Prenter, S., et al. (2012). Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects. *Nat. Med.* *18*, 1087–1094.
- Jin, M.-M., and Chen, Z. (2011). Role of gap junctions in epilepsy. *Neurosci. Bull.* *27*, 389–406.
- Kellinghaus, C., Loddenkemper, T., Möddel, G., Tergau, F., Lüders, J., Lüdemann, P., Nair, D.R., and Lüders, H.O. (2003). [Electric brain stimulation for epilepsy therapy]. *Nervenarzt* *74*, 664–676.
- Khan, S., Wright, I., Javed, S., Sharples, P., Jardine, P., Carter, M., and Gill, S.S. (2009). High frequency stimulation of the mamillothalamic tract for the treatment of resistant seizures associated with hypothalamic hamartoma. *Epilepsia* *50*, 1608–1611.

- Kile, K.B., Tian, N., and Durand, D.M. (2010a). Low Frequency Stimulation Decreases Seizure Activity in a Mutation Model of Epilepsy. *Epilepsia* 51, 1745–1753.
- Kile, K.B., Tian, N., and Durand, D.M. (2010b). Low Frequency Stimulation Decreases Seizure Activity in a Mutation Model of Epilepsy. *Epilepsia* 51, 1745–1753.
- Kim, E.K., and Choi, E.-J. (2015). Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch. Toxicol.* 89, 867–882.
- Kim, E.-J., Kang, I.-H., Lee, J.W., Jang, W.-G., and Koh, J.-T. (2013). MiR-433 mediates ERRγ-suppressed osteoblast differentiation via direct targeting to Runx2 mRNA in C3H10T1/2 cells. *Life Sci.* 92, 562–568.
- Kim, S., Hwang, D.W., and Lee, D.S. (2009). A study of microRNAs in silico and in vivo: bioimaging of microRNA biogenesis and regulation. *FEBS J.* 276, 2165–2174.
- Klein, P., Dingledine, R., Aronica, E., Bernard, C., Blümcke, I., Boison, D., Brodie, M.J., Brooks-Kayal, A.R., Engel, J., Forcelli, P.A., et al. (2018). Commonalities in epileptogenic processes from different acute brain insults: Do they translate? *Epilepsia* 59, 37–66.
- Klimovskaia, L.D., Smirnova, N.P., and D’iakonov, A.S. (1985). [Electrical resistance of the brain tissue of rats exposed to a permanent magnetic field]. *Kosm. Biol. Aviakosm. Med.* 19, 62–64.
- Klinger, N.V., and Mittal, S. (2016). Clinical efficacy of deep brain stimulation for the treatment of medically refractory epilepsy. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 140, 11–25.
- Kosik, K.S. (2006). The neuronal microRNA system. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 911–920.
- Koubeissi, M.Z., Kahriman, E., Syed, T.U., Miller, J., and Durand, D.M. (2013). Low-frequency electrical stimulation of a fiber tract in temporal lobe epilepsy. *Ann. Neurol.* 74, 223–231.
- Kretschmann, A., Danis, B., Andonovic, L., Abnaof, K., Rikxoort, M. van, Siegel, F., Mazzuferi, M., Godard, P., Hanon, E., Fröhlich, H., et al. (2014). Different MicroRNA Profiles in Chronic Epilepsy Versus Acute Seizure Mouse Models. *J. Mol. Neurosci.* 55, 466–479.
- Kruse, R. (1990). [Psychomotor epilepsy: phenomenology, localization, pathogenesis and therapy]. *Schweiz. Rundsch. Med. Prax. Rev. Suisse Med. Prax.* 79, 757–766.
- Kwan, P., and Brodie, M.J. (2000). Early identification of refractory epilepsy. *N. Engl. J. Med.* 342, 314–319.
- Kwan, P., Sills, G.J., and Brodie, M.J. (2001). The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. *Pharmacol. Ther.* 90, 21–34.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858–862.
- Laxpati, N.G., Kasoff, W.S., and Gross, R.E. (2014). Deep Brain Stimulation for the Treatment of Epilepsy: Circuits, Targets, and Trials. *Neurotherapeutics* 11, 508–526.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.

de Lemos, L., Junyent, F., Camins, A., Castro-Torres, R.D., Folch, J., Olloquequi, J., Beas-Zarate, C., Verdaguer, E., and Auladell, C. (2018). Neuroprotective Effects of the Absence of JNK1 or JNK3 Isoforms on Kainic Acid-Induced Temporal Lobe Epilepsy-Like Symptoms. *Mol. Neurobiol.* 55, 4437–4452.

Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* 120, 15–20.

Li, G., Bauer, S., Nowak, M., Norwood, B., Tackenberg, B., Rosenow, F., Knake, S., Oertel, W.H., and Hamer, H.M. (2011). Cytokines and epilepsy. *Seizure* 20, 249–256.

Li, H., Chen, X., Guan, L., Qi, Q., Shu, G., Jiang, Q., Yuan, L., Xi, Q., and Zhang, Y. (2013a). MiRNA-181a Regulates Adipogenesis by Targeting Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the Porcine Model. *PLOS ONE* 8, e71568.

Li, R., Chung, A.C.K., Dong, Y., Yang, W., Zhong, X., and Lan, H.Y. (2013b). The microRNA miR-433 promotes renal fibrosis by amplifying the TGF- $\beta$ /Smad3-Azin1 pathway. *Kidney Int.* 84, 1129–1144.

Li, W., Chang, N., Tian, L., Yang, J., Ji, X., Xie, J., Yang, L., and Li, L. (2017). miR-27b-3p, miR-181a-1-3p, and miR-326-5p are involved in the inhibition of macrophage activation in chronic liver injury. *J. Mol. Med.* 95, 1091–1105.

Lian, J., Bikson, M., Sciortino, C., Stacey, W.C., and Durand, D.M. (2003). Local Suppression of Epileptiform Activity by Electrical Stimulation in Rat Hippocampus In Vitro. *J. Physiol.* 547, 427–434.

Lihua, J., Feng, G., Shanshan, M., Jialu, X., and Kewen, J. (2017). Somatic KRAS mutation in an infant with linear nevus sebaceous syndrome associated with lymphatic malformations: A case report and literature review. *Medicine (Baltimore)* 96, e8016.

Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769–773.

Lin, X., Rice, K.L., Buzzai, M., Hexner, E., Costa, F.F., Kilpivaara, O., Mullally, A., Soares, M.B., Ebert, B.L., Levine, R., et al. (2013). miR-433 is aberrantly expressed in myeloproliferative neoplasms and suppresses hematopoietic cell growth and differentiation. *Leukemia* 27, 344–352.

Lopez, J.P., Fiori, L.M., Cruceanu, C., Lin, R., Labonte, B., Cates, H.M., Heller, E.A., Vialou, V., Ku, S.M., Gerald, C., et al. (2017). MicroRNAs 146a/b-5 and 425-3p and 24-3p are markers of antidepressant response and regulate MAPK/Wnt-system genes. *Nat. Commun.* 8, 15497.

López-Meraz, M.L., Neri-Bazán, L., and Rocha, L. (2004). Low frequency stimulation modifies receptor binding in rat brain. *Epilepsy Res.* 59, 95–105.

Löscher, W. (2002). Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 50, 105–123.

Löscher, W., and Brandt, C. (2010). Prevention or Modification of Epileptogenesis after Brain Insults: Experimental Approaches and Translational Research. *Pharmacol. Rev.* 62, 668–700.

- Löscher, W., Wahnschaffe, U., Hönack, D., and Rundfeldt, C. (1995). Does prolonged implantation of depth electrodes predispose the brain to kindling? *Brain Res.* 697, 197–204.
- Lüders, H., Acharya, J., Baumgartner, C., Benbadis, S., Bleasel, A., Burgess, R., Dinner, D.S., Ebner, A., Foldvary, N., Geller, E., et al. (1998). Semiological seizure classification. *Epilepsia* 39, 1006–1013.
- Luo, H., Zhang, H., Zhang, Z., Zhang, X., Ning, B., Guo, J., Nie, N., Liu, B., and Wu, X. (2009). Down-regulated miR-9 and miR-433 in human gastric carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* CR 28, 82.
- Luttrell, L.M., and Miller, W.E. (2013). Chapter Five - Arrestins as Regulators of Kinases and Phosphatases. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, L.M. Luttrell, ed. (Academic Press), pp. 115–147.
- Magariños-Ascone, C., Pazo, J.H., Macadar, O., and Buño, W. (2002). High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus silences subthalamic neurons: a possible cellular mechanism in Parkinson's disease. *Neuroscience* 115, 1109–1117.
- Majumder, P., Roy, K., Singh, B.K., Jana, N.R., and Mukhopadhyay, D. (2017). Cellular levels of Grb2 and cytoskeleton stability are correlated in a neurodegenerative scenario. *Dis. Model. Mech.* 10, 655–669.
- Maroso, M., Balosso, S., Ravizza, T., Liu, J., Aronica, E., Iyer, A.M., Rossetti, C., Molteni, M., Casalgrandi, M., Manfredi, A.A., et al. (2010). Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat. Med.* 16, 413–419.
- McIntyre, D.C., Poulter, M.O., and Gilby, K. (2002). Kindling: some old and some new. *Epilepsy Res.* 50, 79–92.
- McKiernan, R.C., Jimenez-Mateos, E.M., Bray, I., Engel, T., Brennan, G.P., Sano, T., Michalak, Z., Moran, C., Delanty, N., Farrell, M., et al. (2012). Reduced mature microRNA levels in association with dicer loss in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *PLoS One* 7, e35921.
- Meyer, M., Kienzler-Norwood, F., Bauer, S., Rosenow, F., and Norwood, B.A. (2016). Removing entorhinal cortex input to the dentate gyrus does not impede low frequency oscillations, an EEG-biomarker of hippocampal epileptogenesis. *Sci. Rep.* 6.
- Miller-Delaney, S.F.C., Bryan, K., Das, S., McKiernan, R.C., Bray, I.M., Reynolds, J.P., Gwinn, R., Stallings, R.L., and Henshall, D.C. (2015). Differential DNA methylation profiles of coding and non-coding genes define hippocampal sclerosis in human temporal lobe epilepsy. *Brain* 138, 616–631.
- Mohammad-Zadeh, M., Mirnajafi-Zadeh, J., Fathollahi, Y., Javan, M., Jahanshahi, A., Noorbakhsh, S.M., and Motamedi, F. (2009). The role of adenosine A1 receptors in mediating the inhibitory effects of low frequency stimulation of perforant path on kindling acquisition in rats. *Neuroscience* 158, 1632–1643.
- Mooney, C., Becker, B.A., Raoof, R., and Henshall, D.C. (2016). EpimiRBase: a comprehensive database of microRNA-epilepsy associations. *Bioinformatics* 32, 1436–1438.
- Morimoto, K., Fahnestock, M., and Racine, R.J. (2004). Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog. Neurobiol.* 73, 1–60.

- Mouri, G., Jimenez-Mateos, E., Engel, T., Dunleavy, M., Hatazaki, S., Paucard, A., Matsushima, S., Taki, W., and Henshall, D.C. (2008). Unilateral hippocampal CA3-predominant damage and short latency epileptogenesis after intra-amygdala microinjection of kainic acid in mice. *Brain Res.* 1213, 140–151.
- Natoli, G., Costanzo, A., Moretti, F., Fulco, M., Balsano, C., and Levrero, M. (1997). Tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 signaling downstream of TNF receptor-associated factor 2. Nuclear factor kappaB (NFkappaB)-inducing kinase requirement for activation of activating protein 1 and NFkappaB but not of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 26079–26082.
- Newton, S.S., Collier, E.F., Bennett, A.H., Russell, D.S., and Duman, R.S. (2004). Regulation of growth factor receptor bound 2 by electroconvulsive seizure. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 129, 185–188.
- Norwood, B.A., Bumanglag, A.V., Osculati, F., Sbarbati, A., Marzola, P., Nicolato, E., Fabene, P.F., and Sloviter, R.S. (2010). Classic hippocampal sclerosis and hippocampal-onset epilepsy produced by a single “cryptic” episode of focal hippocampal excitation in awake rats. *J. Comp. Neurol.* 518, 3381–3407.
- Norwood, B.A., Bauer, S., Wegner, S., Hamer, H.M., Oertel, W.H., Sloviter, R.S., and Rosenow, F. (2011). Electrical stimulation-induced seizures in rats: A “dose-response” study on resultant neurodegeneration. *Epilepsia* 52, e109–e112.
- Nunnari, G., and Schnell, M.J. (2011). MicroRNA-122: a therapeutic target for hepatitis C virus (HCV) infection. *Front. Biosci. Sch. Ed.* 3, 1032–1037.
- Pál, G., Lovas, G., and Dobolyi, A. (2014). Induction of Transforming Growth Factor Beta Receptors following Focal Ischemia in the Rat Brain. *PLOS ONE* 9, e106544.
- Papez, J.W. (1995). A proposed mechanism of emotion. 1937. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 7, 103–112.
- Park, K., and Kim, K.-B. (2013). miRTar Hunter: A Prediction System for Identifying Human microRNA Target Sites. *Mol. Cells* 35, 195–201.
- Peng, J., Omran, A., Ashhab, M.U., Kong, H., Gan, N., He, F., and Yin, F. (2013). Expression patterns of miR-124, miR-134, miR-132, and miR-21 in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy. *J. Mol. Neurosci.* MN 50, 291–297.
- Pitkänen, A. (2002). Drug-mediated neuroprotection and antiepileptogenesis: animal data. *Neurology* 59, S27-33.
- Pitkänen, A., Buckmaster, P.S., Galanopoulou, A.S., and Moshé, S.L. (2017). *Models of Seizures and Epilepsy: Second Edition* (Elsevier Inc.).
- Pollen, D.A., and Trachtenberg, M.C. (1970). Neuroglia: gliosis and focal epilepsy. *Science* 167, 1252–1253.
- Portelli, J., Aourz, N., De Bundel, D., Meurs, A., Smolders, I., Michotte, Y., and Clinckers, R. (2009). Intrastrain differences in seizure susceptibility, pharmacological response and basal neurochemistry of Wistar rats. *Epilepsy Res.* 87, 234–246.



- Prince, D.A., Parada, I., and Graber, K. (2012). Traumatic Brain Injury and Posttraumatic Epilepsy. In Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, J.L. Noebels, M. Avoli, M.A. Rogawski, R.W. Olsen, and A.V. Delgado-Escueta, eds. (Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)), p.
- Proper, E.A., Hoogland, G., Kappen, S.M., Jansen, G.H., Rensen, M.G.A., Schrama, L.H., van Veelen, C.W.M., van Rijen, P.C., van Nieuwenhuizen, O., Gispen, W.H., et al. (2002). Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain J. Neurol.* *125*, 32–43.
- Pua, H.H., Steiner, D.F., Patel, S., Gonzalez, J.R., Ortiz-Carpena, J.F., Kageyama, R., Chiou, N.-T., Gallman, A., de Kouchkovsky, D., Jeker, L.T., et al. (2016). MicroRNAs 24 and 27 Suppress Allergic Inflammation and Target a Network of Regulators of T Helper 2 Cell-Associated Cytokine Production. *Immunity* *44*, 821–832.
- Pustina, D., Doucet, G., Evans, J., Sharan, A., Sperling, M., Skidmore, C., and Tracy, J. (2014). Distinct types of white matter changes are observed after anterior temporal lobectomy in epilepsy. *PLoS One* *9*, e104211.
- Qu, Z., Su, F., Qi, X., Sun, J., Wang, H., Qiao, Z., Zhao, H., and Zhu, Y. (2017). Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway mediated aberrant hippocampal neurogenesis in kainic acid-induced epilepsy. *Cell Biochem. Funct.* *35*, 472–476.
- Rajman, M., Metge, F., Fiore, R., Khudayberdiev, S., Aksoy-Aksel, A., Bicker, S., Reschke, C.R., Raoof, R., Brennan, G.P., Delanty, N., et al. (2017). A microRNA-129-5p/Rbfox crosstalk coordinates homeostatic downscaling of excitatory synapses. *EMBO J.* *36*, 1770–1787.
- Raoof, R., Jimenez-Mateos, E.M., Bauer, S., Tackenberg, B., Rosenow, F., Lang, J., Onugoren, M.D., Hamer, H., Huchtemann, T., Körtvélyessy, P., et al. (2017). Cerebrospinal fluid microRNAs are potential biomarkers of temporal lobe epilepsy and status epilepticus. *Sci. Rep.* *7*.
- Rashid, S., Pho, G., Czigler, M., Werz, M.A., and Durand, D.M. (2012a). Low Frequency Stimulation of Hippocampal Commissures Reduces Seizures in Chronic Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia* *53*, 147–156.
- Rashid, S., Pho, G., Czigler, M., Werz, M.A., and Durand, D.M. (2012b). Low frequency stimulation of ventral hippocampal commissures reduces seizures in a rat model of chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* *53*, 147–156.
- Represa, A., Jorquera, I., Le Gal La Salle, G., and Ben-Ari, Y. (1993). Epilepsy induced collateral sprouting of hippocampal mossy fibers: does it induce the development of ectopic synapses with granule cell dendrites? *Hippocampus* *3*, 257–268.
- Reschke, C.R., Silva, L.F.A., Norwood, B.A., Senthilkumar, K., Morris, G., Sanz-Rodriguez, A., Conroy, R.M., Costard, L., Neubert, V., Bauer, S., et al. (2017). Potent Anti-seizure Effects of Locked Nucleic Acid Antagomirs Targeting miR-134 in Multiple Mouse and Rat Models of Epilepsy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *6*, 45–56.
- Révész, D., Rydenhag, B., and Ben-Menachem, E. (2016). Complications and safety of vagus nerve stimulation: 25 years of experience at a single center. *J. Neurosurg. Pediatr.* *18*, 97–104.
- Reynolds, E.H. (2000). The ILAE/IBE/WHO Global Campaign against Epilepsy: Bringing Epilepsy "Out of the Shadows." *Epilepsy Behav.* *1*, S3–S8.

- Ridsdale, L., Wojewodka, G., Robinson, E., Landau, S., Noble, A., Taylor, S., Richardson, M., Baker, G., Goldstein, L.H., and SMILE Team (2017). Characteristics associated with quality of life among people with drug-resistant epilepsy. *J. Neurol.*
- Riffo-Campos, Á.L., Riquelme, I., and Brebi-Mieville, P. (2016). Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? *Int. J. Mol. Sci.* 17.
- Risbud, R.M., and Porter, B.E. (2013a). Changes in microRNA expression in the whole hippocampus and hippocampal synaptoneurosome fraction following pilocarpine induced status epilepticus. *PLoS One* 8, e53464.
- Risbud, R.M., and Porter, B.E. (2013b). Changes in MicroRNA Expression in the Whole Hippocampus and Hippocampal Synaptoneurosome Fraction following Pilocarpine Induced Status Epilepticus. *PLoS ONE* 8, e53464.
- Risbud, R.M., and Porter, B.E. (2013c). Changes in MicroRNA Expression in the Whole Hippocampus and Hippocampal Synaptoneurosome Fraction following Pilocarpine Induced Status Epilepticus. *PLoS ONE* 8.
- Robertson, S., MacKenzie, S.M., Alvarez-Madrazo, S., Diver, L.A., Lin, J., Stewart, P.M., Fraser, R., Connell, J.M., and Davies, E. (2013). MicroRNA-24 is a novel regulator of aldosterone and cortisol production in the human adrenal cortex. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 62, 572–578.
- Roncon, P., Soukupová, M., Binaschi, A., Falcicchia, C., Zucchini, S., Ferracin, M., Langley, S.R., Petretto, E., Johnson, M.R., Marucci, G., et al. (2015). MicroRNA profiles in hippocampal granule cells and plasma of rats with pilocarpine-induced epilepsy – comparison with human epileptic samples. *Sci. Rep.* 5, 14143.
- Ross, S.P., Baker, K.E., Fisher, A., Hoff, L., Pak, E.S., and Murashov, A.K. (2018). miRNA-431 Prevents Amyloid- $\beta$ -Induced Synapse Loss in Neuronal Cell Culture Model of Alzheimer's Disease by Silencing Kremen1. *Front. Cell. Neurosci.* 12.
- Sadangi, C., Rosenow, F., and Norwood, B.A. (2017). Validation of reference genes for quantitative gene expression analysis in experimental epilepsy. *J. Neurosci. Res.* 95, 2357–2366.
- Sadowski, K., Kotulska-Jóźwiak, K., and Jóźwiak, S. (2015). Role of mTOR inhibitors in epilepsy treatment. *Pharmacol. Rep.* 67, 636–646.
- Salanova, V., Witt, T., Worth, R., Henry, T.R., Gross, R.E., Nazzaro, J.M., Labar, D., Sperling, M.R., Sharan, A., Sandok, E., et al. (2015). Long-term efficacy and safety of thalamic stimulation for drug-resistant partial epilepsy. *Neurology* 84, 1017–1025.
- Sander, J.W. (2003). The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr. Opin. Neurol.* 16, 165–170.
- Satoh, J.-I., Kino, Y., and Niida, S. (2015). MicroRNA-Seq Data Analysis Pipeline to Identify Blood Biomarkers for Alzheimer's Disease from Public Data. *Biomark. Insights* 10, 21–31.
- Schaefer, A., O'Carroll, D., Tan, C.L., Hillman, D., Sugimori, M., Llinas, R., and Greengard, P. (2007). Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J. Exp. Med.* 204, 1553–1558.

- Schiller, Y., and Bankirer, Y. (2007). Cellular mechanisms underlying antiepileptic effects of low- and high-frequency electrical stimulation in acute epilepsy in neocortical brain slices in vitro. *J. Neurophysiol.* 97, 1887–1902.
- Schouten, M., Fratantoni, S.A., Hubens, C.J., Piersma, S.R., Pham, T.V., Bielefeld, P., Voskuyl, R.A., Lucassen, P.J., Jimenez, C.R., and Fitzsimons, C.P. (2015). MicroRNA-124 and -137 cooperativity controls caspase-3 activity through BCL2L13 in hippocampal neural stem cells. *Sci. Rep.* 5.
- Schouten, M., Bielefeld, P., Fratantoni, S.A., Hubens, C.J., Piersma, S.R., Pham, T.V., Voskuyl, R.A., Lucassen, P.J., Jimenez, C.R., and Fitzsimons, C.P. (2016). Multi-omics profile of the mouse dentate gyrus after kainic acid-induced status epilepticus. *Sci. Data* 3, 160068.
- Schrader, L.M., Stern, J.M., Wilson, C.L., Fields, T.A., Salamon, N., Nuwer, M.R., Vespa, P.M., and Fried, I. (2006). Low frequency electrical stimulation through subdural electrodes in a case of refractory status epilepticus. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* 117, 781–788.
- Schratt, G.M., Tuebing, F., Nigh, E.A., Kane, C.G., Sabatini, M.E., Kiebler, M., and Greenberg, M.E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439, 283–289.
- Schröder, W., Hinterkeuser, S., Seifert, G., Schramm, J., Jabs, R., Wilkin, G.P., and Steinhäuser, C. (2000). Functional and Molecular Properties of Human Astrocytes in Acute Hippocampal Slices Obtained from Patients with Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia* 41, S181–S184.
- Schulze-Bonhage, A. (2017). Brain stimulation as a neuromodulatory epilepsy therapy. *Seizure.*
- Schwob, J.E., Fuller, T., Price, J.L., and Olney, J.W. (1980). Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience* 5, 991–1014.
- Seifert, G., Hüttmann, K., Schramm, J., and Steinhäuser, C. (2004). Enhanced relative expression of glutamate receptor 1 flip AMPA receptor subunits in hippocampal astrocytes of epilepsy patients with Ammon's horn sclerosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 1996–2003.
- Seitz, H., Royo, H., Bortolin, M.-L., Lin, S.-P., Ferguson-Smith, A.C., and Cavaillé, J. (2004). A Large Imprinted microRNA Gene Cluster at the Mouse Dlk1-Gtl2 Domain. *Genome Res.* 14, 1741–1748.
- Semah, F., Picot, M.C., Adam, C., Broglin, D., Arzimanoglou, A., Bazin, B., Cavalcanti, D., and Baulac, M. (1998). Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 51, 1256–1262.
- Sengupta, P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int. J. Prev. Med.* 4, 624–630.
- Sheng, W.S., Hu, S., Ni, H.T., Rowen, T.N., Lokensgard, J.R., and Peterson, P.K. (2005). TNF-alpha-induced chemokine production and apoptosis in human neural precursor cells. *J. Leukoc. Biol.* 78, 1233–1241.

- Shi, L.-H., Luo, F., Woodward, D., and Chang, J.-Y. (2006). Deep brain stimulation of the substantia nigra pars reticulata exerts long lasting suppression of amygdala-kindled seizures. *Brain Res.* 1090, 202–207.
- Sloviter, R.S. (2017). Epileptogenesis meets Occam’s Razor. *Curr. Opin. Pharmacol.* 35, 105–110.
- Sloviter, R.S., and Bumanglag, A.V. (2013). Defining “epileptogenesis” and identifying “antiepileptogenic targets” in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem. *Neuropharmacology* 69, 3–15.
- Song, Y.-J., Tian, X.-B., Zhang, S., Zhang, Y.-X., Li, X., Li, D., Cheng, Y., Zhang, J.-N., Kang, C.-S., and Zhao, W. (2011). Temporal lobe epilepsy induces differential expression of hippocampal miRNAs including let-7e and miR-23a/b. *Brain Res.* 1387, 134–140.
- Sood, P., Krek, A., Zavolan, M., Macino, G., and Rajewsky, N. (2006). Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2746–2751.
- Soreq, L., Salomonis, N., Bronstein, M., Greenberg, D.S., Israel, Z., Bergman, H., and Soreq, H. (2013). Small RNA sequencing-microarray analyses in Parkinson leukocytes reveal deep brain stimulation-induced splicing changes that classify brain region transcriptomes. *Front. Mol. Neurosci.* 6, 10.
- Sosanya, N.M., Huang, P.P.C., Cacheaux, L.P., Chen, C.J., Nguyen, K., Perrone-Bizzozero, N.I., and Raab-Graham, K.F. (2013). Degradation of high affinity HuD targets releases Kv1.1 mRNA from miR-129 repression by mTORC1. *J. Cell Biol.* 202, 53–69.
- Sramka, M., Fritz, G., Galanda, M., and Nádvorník, P. (1976). Some observations in treatment stimulation of epilepsy. *Acta Neurochir. (Wien)* 257–262.
- Srinivas, H.V., and Shah, U. (2017). Comorbidities of epilepsy. *Neurol. India* 65, 18.
- Stephani, C., and Koubeissi, M. (2015). Differences of Intracranial Electrical Stimulation Thresholds in the Human Brain. *Brain Stimulat.* 8, 724–729.
- van Strien, N.M., Cappaert, N.L.M., and Witter, M.P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 272–282.
- Sun, H.-L., Zhang, S.-H., Zhong, K., Xu, Z.-H., Zhu, W., Fang, Q., Wu, D.-C., Hu, W.-W., Xiao, B., and Chen, Z. (2010). Mode-dependent effect of low-frequency stimulation targeting the hippocampal CA3 subfield on amygdala-kindled seizures in rats. *Epilepsy Res.* 90, 83–90.
- Sun, Y., Wang, X., Wang, Z., Zhang, Y., Che, N., Luo, X., Tan, Z., Sun, X., Li, X., Yang, K., et al. (2016). Expression of microRNA-129-2-3p and microRNA-935 in plasma and brain tissue of human refractory epilepsy. *Epilepsy Res.* 127, 276–283.
- Surges, R., and Sander, J.W. (2012). Sudden unexpected death in epilepsy: mechanisms, prevalence, and prevention. *Curr. Opin. Neurol.* 25, 201–207.
- Swadlow, H.A., and Waxman, S.G. (1975). Observations on impulse conduction along central axons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 5156–5159.

- Swann, J.W., Al-Noori, S., Jiang, M., and Lee, C.L. (2000). Spine loss and other dendritic abnormalities in epilepsy. *Hippocampus* 10, 617–625.
- Swanson, L.W., Wyss, J.M., and Cowan, W.M. (1978). An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *J. Comp. Neurol.* 181, 681–715.
- Tang, X., Lin, J., Wang, G., and Lu, J. (2017). MicroRNA-433-3p promotes osteoblast differentiation through targeting DKK1 expression. *PloS One* 12, e0179860.
- Tao, L., Bei, Y., Chen, P., Lei, Z., Fu, S., Zhang, H., Xu, J., Che, L., Chen, X., Sluijter, J.P., et al. (2016). Crucial Role of miR-433 in Regulating Cardiac Fibrosis. *Theranostics* 6, 2068–2083.
- Téllez-Zenteno, J.F., and Hernández-Ronquillo, L. (2012). A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Res. Treat.* 2012.
- Téllez-Zenteno, J.F., Patten, S.B., Jetté, N., Williams, J., and Wiebe, S. (2007). Psychiatric Comorbidity in Epilepsy: A Population-Based Analysis. *Epilepsia* 48, 2336–2344.
- Thom, M. (2014). Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 40, 520–543.
- Titze-de-Almeida, R., David, C., and Titze-de-Almeida, S.S. (2017). The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. *Pharm. Res.* 34, 1339–1363.
- Toprani, S., and Durand, D.M. (2013). Long-lasting hyperpolarization underlies seizure reduction by low frequency deep brain electrical stimulation. *J. Physiol.* 591, 5765–5790.
- Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D., Rossetti, A.O., Scheffer, I.E., Shinnar, S., Shorvon, S., and Lowenstein, D.H. (2015). A definition and classification of status epilepticus – Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia* 56, 1515–1523.
- Unterberger, I., Bauer, R., Walser, G., and Bauer, G. (2016). Corpus callosum and epilepsies. *Seizure* 37, 55–60.
- Urbano, F.J., Leznik, E., and Llinás, R.R. (2002). Cortical activation patterns evoked by afferent axons stimuli at different frequencies: an in vitro voltage-sensitive dye imaging study. *Thalamus Relat. Syst.* 1, 371–378.
- Ure, J.A., and Perassolo, M. (2000). Update on the pathophysiology of the epilepsies. *J. Neurol. Sci.* 177, 1–17.
- Vale-Martínez, A., Guillazo-Blanch, G., Aldavert-Vera, L., Segura-Torres, P., and Martí-Nicolovius, M. (1999). Intracranial self-stimulation in the parafascicular nucleus of the rat. *Brain Res. Bull.* 48, 401–406.
- Van Buren, J.M., Wood, J.H., Oakley, J., and Hambrecht, F. (1978). Preliminary evaluation of cerebellar stimulation by double-blind stimulation and biological criteria in the treatment of epilepsy. *J. Neurosurg.* 48, 407–416.
- Van Nieuwenhuysse, B., Vonck, K., Raedt, R., Meurs, A., Wadman, W., and Boon, P. (2012). Deep brain stimulation early during epileptogenesis modifies disease progression in the hippocampus. *EPILEPSIA* 53, 26–27.

Van Nieuwenhuysse, B., Raedt, R., Delbeke, J., Wadman, W.J., Boon, P., and Vonck, K. (2015). In Search of Optimal DBS Paradigms to Treat Epilepsy: Bilateral Versus Unilateral Hippocampal Stimulation in a Rat Model for Temporal Lobe Epilepsy. *Brain Stimulat.* 8, 192–199.

Velasco, A.L., Velasco, M., Velasco, F., Menes, D., Gordon, F., Rocha, L., Briones, M., and Márquez, I. (2000a). Subacute and Chronic Electrical Stimulation of the Hippocampus on Intractable Temporal Lobe Seizures: Preliminary Report. *Arch. Med. Res.* 31, 316–328.

Velasco, A.L., Velasco, F., Velasco, M., Trejo, D., Castro, G., and Carrillo-Ruiz, J.D. (2007). Electrical stimulation of the hippocampal epileptic foci for seizure control: a double-blind, long-term follow-up study. *Epilepsia* 48, 1895–1903.

Velasco, M., Velasco, F., Velasco, A.L., Boleaga, B., Jimenez, F., Brito, F., and Marquez, I. (2000b). Subacute electrical stimulation of the hippocampus blocks intractable temporal lobe seizures and paroxysmal EEG activities. *Epilepsia* 41, 158–169.

Vieira, A.S., de Matos, A.H., do Canto, A.M., Rocha, C.S., Carvalho, B.S., Pascoal, V.D.B., Norwood, B., Bauer, S., Rosenow, F., Gilioli, R., et al. (2016a). RNA sequencing reveals region-specific molecular mechanisms associated with epileptogenesis in a model of classical hippocampal sclerosis. *Sci. Rep.* 6.

Vieira, A.S., de Matos, A.H., do Canto, A.M., Rocha, C.S., Carvalho, B.S., Pascoal, V.D.B., Norwood, B., Bauer, S., Rosenow, F., Gilioli, R., et al. (2016b). RNA sequencing reveals region-specific molecular mechanisms associated with epileptogenesis in a model of classical hippocampal sclerosis. *Sci. Rep.* 6.

Vistbakka, J., Sumelahti, M.-L., Lehtimäki, T., Elovaara, I., and Hagman, S. (2018). Evaluation of serum miR-191-5p, miR-24-3p, miR-128-3p, and miR-376c-3 in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol. Scand.*

Vlachos, I.S., Kostoulas, N., Vergoulis, T., Georgakilas, G., Reczko, M., Maragkakis, M., Paraskevopoulou, M.D., Prionidis, K., Dalamagas, T., and Hatzigeorgiou, A.G. (2012). DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res.* 40, W498–W504.

Vlachos, I.S., Paraskevopoulou, M.D., Karagkouni, D., Georgakilas, G., Vergoulis, T., Kanellos, I., Anastasopoulos, I.-L., Maniou, S., Karathanou, K., Kalfakakou, D., et al. (2015). DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 43, D153–D159.

Vliet, V., A, E., da Costa Araújo, S., Redeker, S., van Schaik, R., Aronica, E., and Gorter, J.A. (2007). Blood–brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* 130, 521–534.

Volk, H.A., Arabadzisz, D., Fritschy, J.-M., Brandt, C., Bethmann, K., and Löscher, W. (2006). Antiepileptic drug-resistant rats differ from drug-responsive rats in hippocampal neurodegeneration and GABA(A) receptor ligand binding in a model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 21, 633–646.

Vonck, K., Sprengers, M., Carrette, E., Dauwe, I., Miatton, M., Meurs, A., Goossens, L., De Herdt, V., Achten, R., Thiery, E., et al. (2012). A decade of experience with deep brain stimulation for patients with refractory medial temporal lobe epilepsy. *Int. J. Neural Syst.* 23, 1250034.

- Walczak, C., Gaignier, F., Gilet, A., Zou, F., Thornton, S.N., and Ropars, A. (2011). Aldosterone increases VEGF-A production in human neutrophils through PI3K, ERK1/2 and p38 pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 2125–2132.
- Walker, M.C., White, H.S., and Sander, J.W. a. S. (2002). Disease modification in partial epilepsy. *Brain J. Neurol.* 125, 1937–1950.
- Wang, G., van der Walt, J.M., Mayhew, G., Li, Y.-J., Züchner, S., Scott, W.K., Martin, E.R., and Vance, J.M. (2008). Variation in the miRNA-433 Binding Site of FGF20 Confers Risk for Parkinson Disease by Overexpression of  $\alpha$ -Synuclein. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 283–289.
- Wang, H., Qian, Y., Wu, B., Zhang, P., and Zhou, W. (2015). KRAS G12D mosaic mutation in a Chinese linear nevus sebaceous syndrome infant. *BMC Med. Genet.* 16.
- Wang, J., Zhu, Y., Jin, F., Tang, L., He, Z., and He, Z. (2016a). Differential expression of circulating microRNAs in blood and haematoma samples from patients with intracerebral haemorrhage. *J. Int. Med. Res.* 44, 419–432.
- Wang, X.-M., Jia, R.-H., Wei, D., Cui, W.-Y., and Jiang, W. (2014). MiR-134 blockade prevents status epilepticus like-activity and is neuroprotective in cultured hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 572, 20–25.
- Wang, Y., Liang, J., Xu, C., Wang, Y., Kuang, Y., Xu, Z., Guo, Y., Wang, S., Gao, F., and Chen, Z. (2016b). Low-frequency stimulation in anterior nucleus of thalamus alleviates kainate-induced chronic epilepsy and modulates the hippocampal EEG rhythm. *Exp. Neurol.* 276, 22–30.
- Webster, K.M., Sun, M., Crack, P., O'Brien, T.J., Shultz, S.R., and Semple, B.D. (2017). Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury. *J. Neuroinflammation* 14.
- Wei, P.-H., Mao, Z.-Q., Cong, F., Wang, B., Ling, Z.-P., Liang, S.-L., and Yu, X.-G. (2017). Connection between bilateral temporal regions: Tractography using human connectome data and diffusion spectrum imaging. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 39, 103–108.
- Weissberg, I., Wood, L., Kamintsky, L., Vazquez, O., Milikovsky, D.Z., Alexander, A., Oppenheim, H., Ardizzone, C., Becker, A., Frigerio, F., et al. (2015). Albumin induces excitatory synaptogenesis through astrocytic TGF- $\beta$ /ALK5 signaling in a model of acquired epilepsy following blood-brain barrier dysfunction. *Neurobiol. Dis.* 78, 115–125.
- Wieser, H.-G., and ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy (2004). ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 45, 695–714.
- Williamson, P.D., French, J.A., Thadani, V.M., Kim, J.H., Novelly, R.A., Spencer, S.S., Spencer, D.D., and Mattson, R.H. (1993). Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: II. Interictal and ictal scalp electroencephalography, neuropsychological testing, neuroimaging, surgical results, and pathology. *Ann. Neurol.* 34, 781–787.
- Winston, G.P., Stretton, J., Sidhu, M.K., Symms, M.R., and Duncan, J.S. (2013). Progressive white matter changes following anterior temporal lobe resection for epilepsy. *NeuroImage Clin.* 4, 190–200.
- Wright, G.D., McLellan, D.L., and Brice, J.G. (1984). A double-blind trial of chronic cerebellar stimulation in twelve patients with severe epilepsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 47, 769–774.

- Wyckhuys, T., Raedt, R., Vonck, K., Wadman, W., and Boon, P. (2010). Comparison of hippocampal Deep Brain Stimulation with high (130 Hz) and low frequency (5 Hz) on afterdischarges in kindled rats. *Epilepsy Res.* *88*, 239–246.
- Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E.J., Golub, T.R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., Lander, E.S., and Kellis, M. (2005). Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* *434*, 338–345.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* *17*, 3011–3016.
- Yuhas, Y., Weizman, A., and Ashkenazi, S. (2003). Bidirectional concentration-dependent effects of tumor necrosis factor alpha in *Shigella dysenteriae*-related seizures. *Infect. Immun.* *71*, 2288–2291.
- Zhang, S.-H., Sun, H.-L., Fang, Q., Zhong, K., Wu, D.-C., Wang, S., and Chen, Z. (2009). Low-frequency stimulation of the hippocampal CA3 subfield is anti-epileptogenic and anti-ictogenic in rat amygdaloid kindling model of epilepsy. *Neurosci. Lett.* *455*, 51–55.
- Ziai, W.C., Sherman, D.L., Bhardwaj, A., Zhang, N., Keyl, P.M., and Mirski, M.A. (2005). Target-specific Catecholamine Elevation Induced by Anticonvulsant Thalamic Deep Brain Stimulation. *Epilepsia* *46*, 878–888.





# **Verzeichnis der Akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren

in Marburg:

Bauer, Plant, Rosenow, Schratt

in Frankfurt:

Acker-Palmer, Auburger, Averhoff, Baumann, Bernardi, Brüggemann, Büchel,,  
Deller, Entian, Fiebach, Freitag, Gaese, Geisslinger, Gottschalk, Grünewald,  
Helmstaedter, Jacoby, Kaiser, Kell, Kieslich, Klein, Korf, Kössl, Liebner, Müller,  
Niederberger, Oehlmann, Osiwacz, Peichl, Pieperbring, Plate, Rami, Roeper,  
Rosenow, Scharf, Schleucher, Schmidt, Schmidtko, Schneider, Schulte,  
Schuman, Schwarzacher, Seifert, Sigurdsson, Soppa, Stehle, Steinmetz,  
Steinbach, Steinmetz, Streit, Tchumatchenko, Tegeder, Triesch, Volknandt,  
Wibral, Wöhnert, Zanella, Zimmermann, Zizka

# Danksagung

Diese Arbeit wurde im Rahmen des EU-finanzierten Kooperationsprojekts „EpimiRNA“, unter der Koordination von Herr Prof. Rosenow und Herr Prof. Henshall, durchgeführt und erstellt. Das Projekt beschäftigt sich mit der Rolle von mikroRNAs in der Entstehung und Behandlung von Epilepsie.

Für die Betreuung der Doktorarbeit bedanke ich mich bei Herr Prof. Rosenow und Herr Prof. Schratt, sowie Dr. Sebastian Bauer. Außerdem möchte ich mir für die Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeit auch bei den übrigen Mitgliedern der AG Translationale Epileptologie, also bei Valentin Neubert, Philipp Müller und Silke Caspari bedanken. Weitere Unterstützung habe ich von den Kooperationspartnern aus Aarhus, Dr. Morten Trillingsgaard Venø und Prof. Kjems sowie Dr. Niamh Connolly und Prof. Prehn aus Dublin erhalten.

Für die Fotos der Versuchstiere bedanke ich mich bei meinem Vater Carsten Costard.

Bei Herr Prof. Plant und Eva Braun bedanke ich mich für die Möglichkeit und die Unterstützung Patch Clamp Versuche durchführen zu können.

Außerdem möchte ich dem Team der Tierpfleger unter der Leitung von Dieter Schäfer sowie bei Guido Schemken für die gute Zusammenarbeit danken.

Außerdem möchte ich mich bei Kathrin Laarmann, Tanja Müller und meiner Schwester Janina bedanken, die die Arbeit korrekturgelesen haben.

